

# **Rekombinante Antikörperfragmente für die Zoonosediagnostics**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

- genehmigte -

**D i s s e r t a t i o n**

von Torsten Meyer  
aus Mühlacker

1. Referent: Prof. Dr. Stefan Dübel  
2. Referent: Prof. Dr. Gerald-Friedrich Gerlach  
eingereicht am: 03.09.2008  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.11.2008  
Druckjahr 2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente . . . . .	1
1.2 Phagen-Display . . . . .	3
1.2.1 M13-Bakteriophage . . . . .	4
1.2.2 Antikörpergenbibliotheken. . . . .	4
1.2.3 Phagen-Display-Technologie . . . . .	6
1.2.4 Affinitätsreifung rekombinanter Antikörperfragmente . . . . .	8
1.2.5 Isolierung von <i>Salmonella</i> - und <i>Campylobacter</i> -spezifischer Antikörper. . . . .	9
1.3 <i>Salmonellen</i> und <i>Campylobacter</i> als Auslöser von Zoonosen. . . . .	9
1.4 <i>Salmonella enterica</i> Subspezies <i>enterica</i> Serotyp Typhimurium . . . . .	10
1.4.1 Pathogenität und Virulenz von <i>Salmonellen</i> . . . . .	11
1.4.2 Diagnostik von <i>Salmonellen</i> . . . . .	12
1.4.3 Direkter Nachweis . . . . .	13
1.4.3.1. Indirekter Nachweis . . . . .	14
1.4.4 Outer membrane protein D (OmpD) . . . . .	15
1.5 <i>Campylobacter coli</i> und <i>Campylobacter jejuni</i> . . . . .	15
1.5.1 Pathogenität und Virulenz von <i>Campylobacter spec.</i> . . . .	17
1.5.2 Diagnostik von <i>Campylobacter spec.</i> . . . .	18
1.5.3 <i>Major outer membrane protein</i> von <i>C. coli</i> und <i>C. jejuni</i> . . . . .	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit . . . . .	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Material . . . . .	21
2.1.1 Verbrauchsmaterialien . . . . .	21
2.1.2 Geräte. . . . .	21
2.1.3 Chemikalien . . . . .	22
2.1.4 Puffer und Lösungen . . . . .	22
2.1.5 Nährmedien und Supplemente . . . . .	25
2.1.6 Bakterienstämme und Bakteriophagen. . . . .	27
2.1.7 Plasmide . . . . .	27
2.1.8 Peptide . . . . .	28
2.1.9 Oligonukleotide . . . . .	28
2.1.10 Enzyme. . . . .	29
2.1.11 Antikörper . . . . .	29
2.1.12 Kit-Systeme . . . . .	29
2.1.13 Computerprogramme und Datenbanken . . . . .	30
2.1.14 Sonstiges . . . . .	30

2.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	31
2.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR . . . . .	31
2.2.1.1. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen . . . . .	31
2.2.1.2. <i>Error-prone</i> -PCR. . . . .	31
2.2.1.3. Kolonie-PCR . . . . .	32
2.2.2 Aufreinigung von DNA mit Kit-Systemen . . . . .	32
2.2.3 Aufreinigung von DNA mittels Ethanol-Fällung. . . . .	32
2.2.4 Isolierung von DNA mit alkalischer Lyse . . . . .	33
2.2.5 Agarosegelelektrophorese . . . . .	33
2.2.6 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration . . . . .	33
2.2.7 Enzymatische Restriktion von DNA . . . . .	34
2.2.8 DNA-Dephosphorylierung . . . . .	34
2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	34
2.2.10 DNA-Sequenzierung . . . . .	35
2.3 Mikrobiologische Methoden. . . . .	35
2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . . . .	35
2.3.2 Transformation mittels Hitzeschock . . . . .	36
2.3.3 Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen. . . . .	36
2.3.4 Herstellung von Bakterienzelllysats . . . . .	36
2.3.5 Anlegen von Glycerinstocks . . . . .	37
2.3.6 Selektion von Antikörperphagenbibliotheken . . . . .	37
2.3.6.1. Panning auf ganzen Zellen . . . . .	37
2.3.6.2. Panning auf rekombinantem Protein . . . . .	38
2.3.6.3. Affinitätspanning nach <i>affinity maturation</i> . . . . .	38
2.3.7 Infektion von <i>E. coli</i> und Produktion von Antikörperphagen . . . . .	39
2.3.8 Titerbestimmung von M13K07-Phagen . . . . .	39
2.3.9 Produktion von scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten . . . . .	40
2.3.10 Produktion von scFv-Fragmenten in Schüttelkolben. . . . .	40
2.3.11 Produktion von GST-OmpD mit His-tag in <i>inclusion bodies</i> . . . . .	41
2.3.12 Produktion von <i>Campylobacter</i> -spezifischen Antigenen . . . . .	41
2.4 Biochemische Methoden . . . . .	42
2.4.1 Isolation der Periplasmatischen Fraktion von <i>E. coli</i> . . . . .	42
2.4.2 Ammoniumsulfatfällung von Produktionsüberständen . . . . .	42
2.4.3 Aufreinigung von scFv-Fragmenten mittels IMAC . . . . .	42
2.4.4 SDS-PAGE . . . . .	43
2.4.5 Coomassiefärbung von Proteingelen . . . . .	43
2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	44
2.4.7 Western-Blot . . . . .	44
2.4.8 Immunfärbung . . . . .	44
2.4.9 Indirekter Antigen-ELISA . . . . .	45
2.4.10 ELISA mit Kompetition . . . . .	45
2.4.11 Epitopbestimmung der isolierten scFv-Fragmente. . . . .	46
2.5 Biophysikalische Methoden . . . . .	47
2.5.1 Größenausschlußchromatographie . . . . .	47
2.5.2 Oberflächenplasmonresonanz (SPR). . . . .	47



<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1	Subtraktives Panning auf <i>Salmonella</i> Typhimurium . . . . .	49
3.2	Isolation von spezifischen scFv-Fragmenten gegen OmpD . . . . .	50
3.2.1	Panning auf rekombinantem GST-OmpD . . . . .	51
3.2.2	Analyse von monoklonal, löslichen scFv-Fragmenten. . . . .	52
3.2.3	Sequenzierung der isolierten scFv-Fragmente . . . . .	54
3.2.4	Klonierung und Produktion von GST-OmpD-His <sub>6</sub> . . . . .	54
3.2.5	Kreuzreaktionsassays mit aufgereinigtem GST-OmpD-His <sub>6</sub> . . . . .	55
3.2.6	Produktion der isolierten scFv-Fragmente im 300 mL-Maßstab. . . . .	57
3.2.7	Test der Spezifität mit Immunfärbung . . . . .	58
3.2.8	Epitopkartierung . . . . .	60
3.2.9	Oberflächenplasmonresonanzmessung mit dem scFv-Fragment TM44-C7 . . . . .	62
3.2.10	Größenausschlusschromatographie . . . . .	63
3.3	Etablierung eines Kompetitions-ELISA für die Diagnostik . . . . .	64
3.3.1	Test der Inkubationsreihenfolge im ELISA . . . . .	64
3.3.2	Test verschiedener scFv-Fragmente im kompetitiven ELISA . . . . .	66
3.4	Verbesserung der scFv-Fragmente mittels <i>error-prone</i> -PCR . . . . .	67
3.4.1	Erzeugung der mutierten Subbibliotheken. . . . .	67
3.4.2	Selektion der Subbibliotheken auf OmpD . . . . .	68
3.5	Isolation von <i>Campylobacter</i> -spezifischen scFv-Fragmenten. . . . .	69
3.5.1	Expression von <i>Campylobacter</i> -Antigenen . . . . .	69
3.5.2	1. Panning auf rekombinantem MompC und MompJ . . . . .	70
3.5.3	Analyse von monoklonalen, löslichen scFv-Fragmenten . . . . .	70
3.5.4	Sequenzierung der isolierten scFv-Klone des 1. Pannings. . . . .	72
3.5.5	2. Panning auf rekombinantem MompC und MompJ . . . . .	72
3.5.6	Analyse von monoklonal, löslichen scFv-Fragmenten aus dem 2. Panning . . . . .	73
3.5.7	Sequenzierung der isolierten scFv-Klone des 2. Pannings. . . . .	75
3.5.8	ELISA zur Analyse von Kreuzreaktionen mit verschiedenen Antigenen . . . . .	75
3.5.9	Produktion der isolierten scFv-Fragmente . . . . .	76
3.5.10	Test der Spezifität mit Immunfärbung . . . . .	78
3.5.11	Epitopkartierung . . . . .	80
3.5.12	Größenausschlusschromatographie . . . . .	82
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
4.1	Isolierung von Membranprotein-spezifischen scFv-Fragmenten . . . . .	82
4.2	Ausblick . . . . .	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>113</b>
8.1	Verwendete Vektoren . . . . .	113
8.2	Membranen für die Epitopbestimmung . . . . .	115
8.2.1	Epitope der OmpD-spezifischen scFv-Fragmente . . . . .	115
8.2.2	Epitope der MompC- und MompJ-spezifischen scFv-Fragmente . . . . .	116

8.3 Produktion der Antigene OmpD, MompC und MompJ . . . . .	118
8.3.1 Immunfärbung von GST-OmpD-His <sub>6</sub> . . . . .	118
8.3.2 Immunfärbung von MompC und MompJ . . . . .	118
<b>9 Danksagung</b>	<b>119</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktur von IgG Antikörpern und Antikörperfragmenten . . . . .	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des M13-Phagen . . . . .	4
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Erstellung einer Antikörpergenbibliothek . .	5
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines M13-scFv-Phagen . . . . .	6
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung einer Selektion von spezifischen Antikörperphage	7
Abbildung 1.6: <i>Salmonella</i> Typhimurium . . . . .	12
Abbildung 1.7: Nachweis von Salmonellen nach L00.00.20 §64 LFGB . . . . .	13
Abbildung 1.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Campylobacter jejuni</i> . . . . .	17
Abbildung 2.1: schematischer Aufbau des kompetitiven ELISA . . . . .	46
Abbildung 3.1: ELISA zur Analyse von Kreuzreaktionen nach subtraktiven Panning . . .	49
Abbildung 3.2: GST-OmpD-Fusionsprotein. . . . .	51
Abbildung 3.3: ELISA mit scFv-Fragmenten aus der HAL4-Bibliothek . . . . .	52
Abbildung 3.4: ELISA mit scFv-Fragmenten aus der HAL7-Bibliothek . . . . .	53
Abbildung 3.5: Sequenzausschnitt von pSOM500 GST-OmpD-His <sub>6</sub> . . . . .	55
Abbildung 3.6: Aufreinigung von GST-OmpD-His . . . . .	55
Abbildung 3.7: ELISA zur Analyse der Kreuzreaktion der isolierten scFv-Fragmente . . .	56
Abbildung 3.8: SDS-PAGE der Produktion der scFv-Fragmente . . . . .	57
Abbildung 3.9: ELISA mit definierten scFv-Konzentrationen . . . . .	58
Abbildung 3.10: Immunfärbung zum Test der Spezifität . . . . .	59
Abbildung 3.11: Epitopkartierung mittels Peptidmembran . . . . .	60
Abbildung 3.12: 3D-Struktur des OmpD-Monomers . . . . .	62
Abbildung 3.13: SPR-Analyse mit TM44-C7 . . . . .	62
Abbildung 3.14: Größenausschlusschromatographie der scFv-Fragmente . . . . .	63
Abbildung 3.15: Test der Inkubationsreihenfolge im ELISA mit Konkurrenz . . . . .	65
Abbildung 3.16: Kompetitiver ELISA der isolierten scFv-Fragmenten und Tierseren . . .	66
Abbildung 3.17: DNA-Agarosegel nach der 5. Mutagenisierungsrunde . . . . .	67
Abbildung 3.18: Polyklonaler Antikörperphagen-ELISA . . . . .	68
Abbildung 3.19: Aufreinigung der <i>Campylobacter</i> -Antigene . . . . .	69
Abbildung 3.20: ELISA mit scFv-Fragmenten aus der 3. Selektionsrunde . . . . .	71
Abbildung 3.21: ELISA mit ausgesuchten scFv-Fragmenten aus der 3. Selektionsrunde. .	72
Abbildung 3.22: ELISAs mit scFv-Fragmenten aus der 3. Selektionsrunde des 2. Pannings	74
Abbildung 3.23: ELISA zur Analyse von Kreuzreaktionen mit isolierten scFv-Fragmenten	76
Abbildung 3.24: SDS-PAGE der Produktion der scFv-Fragmente . . . . .	77
Abbildung 3.25: ELISA mit definierten scFv-Konzentrationen . . . . .	78
Abbildung 3.26: Immunfärbung zum Test der Spezifität . . . . .	79
Abbildung 3.27: Epitopkartierung mittels Peptidmembran . . . . .	80
Abbildung 3.28: Größenausschlusschromatographie der scFv-Fragmente. . . . .	82
Abbildung 8.1: OmpD-Expressionsvektoren . . . . .	113
Abbildung 8.2: scFv-Panning und Expresionsvektoren . . . . .	114
Abbildung 8.3: Epitopkartierung mittels Peptidmembran . . . . .	115
Abbildung 8.4: Epitopkartierung mittels Peptidmembran . . . . .	117
Abbildung 8.5: Immunfärbung von MompC und MompJ und GST-OmpD-His <sub>6</sub> . . . . .	118
Abbildung 8.6: Immunfärbung von MompC und MompJ . . . . .	118



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über die Gattung <i>Salmonella</i> .	11
Tabelle 1.2: Spezies und Subspezies der Gattung <i>Campylobacter</i>	16
Tabelle 2.1: verwendete Verbrauchsmaterialien.	21
Tabelle 2.2: verwendete Geräte	21
Tabelle 2.3: verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen	27
Tabelle 2.4: verwendete Plasmide	27
Tabelle 2.5: verwendete Peptide	28
Tabelle 2.6: verwendete Oligonukleotide	28
Tabelle 2.7: verwendete Enzyme	29
Tabelle 2.8: verwendete Antikörper	29
Tabelle 2.9: verwendete Kit-Systeme	29
Tabelle 2.10: verwendete Computerprogramme und Datenbanken	30
Tabelle 2.11: zusätzliche Materialien	30
Tabelle 2.12: Zusammensetzung und Temperaturprofil der PCR	31
Tabelle 2.13: Zusammensetzung und Temperaturprofil der <i>error-prone</i> -PCR	32
Tabelle 2.14: Zusammensetzung und Temperaturprofil der Kolonie-PCR	32
Tabelle 2.15: Zusammensetzung einer Restriktion	34
Tabelle 2.16: Zusammensetzung einer Ligation	35
Tabelle 2.17: Zusammensetzung einer Sequenzier-PCR	35
Tabelle 2.18: Zusammensetzung der SDS-PAA-Proteingele	43
Tabelle 3.1: Keimbahnlinien der isolierten scFv-Klone aus der Finnern-Bibliothek	50
Tabelle 3.2: Parameter für das Panning auf GST-OmpD	51
Tabelle 3.3: Keimbahnlinien der isolierte scFv-Klone aus der HAL7-Bibliothek.	54
Tabelle 3.4: Proteinausbeuten nach der IMAC	57
Tabelle 3.5: Aminosäuresequenzen der Epitope	61
Tabelle 3.6: Subbibliotheken nach der <i>error-prone</i> -PCR	68
Tabelle 3.7: Parameter für das Panning auf MompC und MompJ.	70
Tabelle 3.8: Parameter für das Panning auf MompC und MompJ.	73
Tabelle 3.9: Keimbahnlinien der isolierte scFv-Klone aus dem 1. und 2. Panning	75
Tabelle 3.10: Proteinausbeuten nach der IMAC	77
Tabelle 3.11: Epitope der scFv-Klone	81



# Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatur in °Celsius
$\alpha$	anti
A	Absorption
$A_{xyz}$	Absorption bei Wellenlänge xyz nm
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AU	Absorption units
BAD	Biotin acceptor domain
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidin Salz
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CBS	<i>Citrat buffered Saline</i>
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
CDR	<i>Complementary determining region</i>
Cfu	<i>Colony forming units</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
$C_H$	konstante Domäne der schweren Kette
$C_L$	konstante Domäne der leichten Kette
cm	Zentimeter
d	Tag
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DF	Durchfluss
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ETOH	Ethanol
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment cristallizable</i>
FR	<i>Framework</i>
Fv	<i>Fragment variable</i>
g	Gramm
×g	Schleuderziffer, vielfaches der Erdbeschleunigung ( $9,81 \frac{m}{s^2}$ )
h	Stunde
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Ig(A,D,E,G,M)	Immunglobulin (A,D,E,G,M)

IMAC	<i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid $k_a$ Assoziationskonstante $\left[ \frac{1}{M * s} \right]$
$K_A$	Gleichgewichts-Assoziationskonstante ( $= k_a * k_d$ ) $\left[ \frac{1}{M} \right]$
$k_d$	Dissoziationskonstante $\left[ \frac{1}{s} \right]$
$K_D$	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $\left( = \frac{1}{K_A} \right) [M]$
L	Liter
M	Molar
mL	Milliliter
MompC	<i>major outer membrane protein Campylobacter coli</i>
MompJ	<i>major outer membrane protein Campylobacter jejuni</i>
min	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MTT	3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTP	Mikrotiterplatte
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
p.a.	<i>pro analysi</i>
OD	optische Dichte
OmpD	<i>Outer membrane protein D</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Phage dilution buffer</i>
PP	Polypropylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>rotations per minute</i>
RU	<i>Resonance Units</i>
scFv	<i>single chain Fragment variable</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
sek	Sekunde
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
S. Typhimurium	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> serotype Typhimurium
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
ÜKS	Überkopfschüttler
üN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel

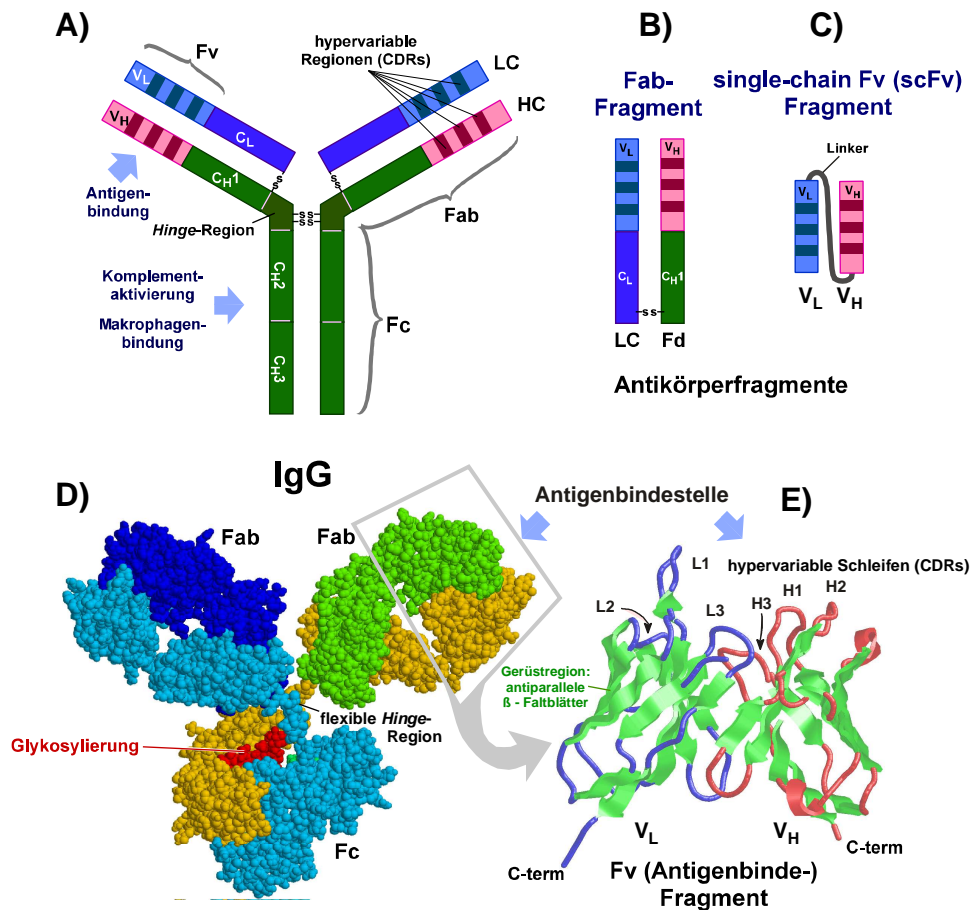


# 1 Einleitung

## 1.1 Antikörper und rekombinante Antikörperfragmente

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind ein wichtiger Teil der Immunantwort der Kiefermäuler (Gnathostomata). Im Körper übernehmen sie die Aufgabe Antigene, beispielsweise Toxine oder Krankheitserreger, zu binden und dadurch für weitere Bestandteile des Immunsystems zu markieren. Antikörper werden von B-Lymphozyten gebildet und in die fünf Isotypen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM unterteilt. IgM Antikörper liegen als Pentamere im Plasma vor und vermitteln in den meisten Fällen die primäre Immunantwort. Nach der Bindung der IgM-Antikörper an die Fremdstoffe (Antigene) können die B-Lymphozyten einen Isotypenwechsel vollziehen und sich anschließend zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren. Je nachdem welcher Isotyp von Antikörpern an der Antigenbindung beteiligt ist kann eine Neutralisation, Opsonierung, Komplementaktivierung oder eine Aktivierung weiterer Bestandteile des Immunsystems erfolgen. IgG-Antikörper sind mit ca. 80 % der Immunglobuline im humanen Serum der am häufigsten zu findende Isotyp. IgG-Antikörper bestehen aus zwei identischen schweren Ketten (HC) und zwei identischen leichten Ketten (LC). Die schweren Ketten besitzen jeweils eine molekulare Masse von 50 kDa, die leichten Ketten jeweils eine Masse von 25 kDa. Insgesamt hat ein IgG-Antikörper eine molekulare Masse von ungefähr 150 kDa. Die beiden schweren Ketten sind in der so genannten *Hinge*-Region über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Die weitere Stabilisierung des Homotetramers erfolgt über nicht kovalente Wechselwirkungen (Abbildung 1.1 A und D). Die schweren Ketten bestehen aus den drei konstanten Regionen  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ . Der Fc-Teil der für die Makrophagenbindung und Komplementaktivierung verantwortlich ist, wird von  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$  beider Ketten gebildet. An  $C_{H2}$  schließt die *Hinge*-Region an, die die Flexibilität der Fab-Fragmente gewährleistet und die Verbindung zu  $C_{H1}$  ist. Die variable Region der schweren Kette wird mit ( $V_H$ ) bezeichnet. Die leichten Ketten bestehen aus einer C-terminalen, konstanten Domäne ( $C_L$ ) und N-terminalen, variablen Domäne ( $V_L$ ). Die leichte und die schwere Kette sind im Bereich von  $C_{H1}$  und  $C_L$  mittels einer Disulfidbrücke verbunden. Die variablen Domänen  $V_H$  und  $V_L$  bilden zusammen das so genannte  $F_V$ -Fragment (Abbildung 1.1 E) und beinhalten die eigentlichen antigenbindenden Bereiche, die so genannten CDRs (*complementarity determining region*).  $V_H$  und  $V_L$  enthalten jeweils drei dieser

hypervariablen Regionen. Die CDRs bilden zusammen mit dem Gerüstbereich (*Framework*) die Antigenbindungsstelle auch Paratop genannt (Janeway et al., 2002)



**Abbildung 1.1: Struktur von IgG Antikörpern und Antikörperfragmenten**

A) Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers B) Schematische Darstellung eines Fab-Fragments C) Schematische Darstellung eines scFv-Fragments D) 3D-Struktur („Space-fill“-Modell) eines IgG-Antikörpers nach Röntgenkristallstrukturanalyse E) Schematische Band-Darstellung der Fv-Region eines IgG-Antikörpers, die Schleifen der CDR-Bereiche sind gesondert gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Dübel (2007)

IgGs sind in der Diagnostik und pharmazeutischen Industrie nicht mehr wegzudenken. Mit einem prognostizierten Marktpotential von 30 Mrd. US \$ bis 2010 für therapeutische, monoklonale Antikörper stellen sie ein enormes Potential dar (Evans, 2005). Antikörperfragmente werden ein immer bedeutsamerer Bestandteil für Therapie und Diagnostik. C<sub>H</sub>1, C<sub>L</sub>, V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub> bilden zusammen das Fab-Fragment (Abbildung 1.1 A und B). Zwei dieser Fragmente können durch den enzymatischen Verdau eines IgGs mit Papain erzeugt werden (Liddell & Weeks, 1996). Ein bivalentes F(ab')<sub>2</sub>-Fragment entsteht durch die Behandlung eines IgGs mit

Pepsin. Bei diesen enzymatischen Reaktionen wird der IgG-Antikörper in der *Hinge*-Region gespalten (Abbas et al., 1996).

Die Gentechnik eröffnet heutzutage die Möglichkeit noch kleinere Antikörperfragmente herzustellen. Das Fv-Fragment besteht nur noch aus den beiden Domänen  $V_H$  und  $V_L$ . Dieses Fragment besitzt entgegen dem Fab-Fragment keine intermolekularen Disulfidbrücken, die eine kovalente Bindung ermöglichen würden, und wird nur durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen  $V_H$  und  $V_L$  stabilisiert. Es erreicht aber nicht die Stabilität des Fab-Fragments. Um diese Fragmente zu stabilisieren wurden die so genannten scFv-Fragmente (*single chain Fragment variable*) entwickelt (Abbildung 1.1 C). Bei diesen Fragmenten wird der C-Terminus von  $V_H$  über einen 15-20 Aminosäuren langen Peptid-Linker mit dem N-Terminus von  $V_L$  verbunden. Die Fragmente haben eine molekulare Masse von ca. 25 kDa. Durch die räumliche Fixierung der beiden Domänen wird die Wahrscheinlichkeit einer Dissoziation beider Domänen verringert. Die beschriebene Reihenfolge von  $V_H$ , Linker und  $V_L$  ist räumlich begünstigt (Schmiedl & Dübel, 2004).

Der Vorteil dieser Antikörperfragmente liegt darin, dass sie in prokaryotischen Zellen und somit kostengünstiger als IgGs in eukaryotischen Expressionssystemen produziert werden können. Weiterhin sind die durch den Fc-Teil vermittelten Effektorfunktionen oft nicht notwendig oder gar nicht erwünscht. Bei therapeutischen Anwendungen zeigen Antikörperfragmente aufgrund ihrer geringeren Größe gegenüber IgGs eine verbesserte Penetration von Tumorgewebe (Beckman et al., 2007) und eine schnellere Ausscheidung über die Nieren.

Ein Nachteil der scFv-Fragmente ist die Tendenz bei hohen Konzentrationen zur Aggregatbildung zu neigen (Wörn & A Plückthun, 2001).

## 1.2 Phagen-Display

In der Vergangenheit wurden polyklonale Antikörpermischungen durch die Immunisierung von Tieren gewonnen (von Behring & Kitasato, 1890). Monoklonale Antikörper werden seit 1975 (Köhler & Milstein, 1975) mit Hilfe der Hybridomtechnologie gewonnen. Mit dieser Technologie können aber keine Antikörper gegen z. B. hochtoxische Substanzen oder hochkonservierte Proteine isoliert werden. Die Technik des Phagen-Display eröffnet die Möglichkeit der Isolation von Antikörpern und Antikörperfragmenten aus Antikörpergenbibliotheken gegen eine Vielzahl von Antigenen.

### 1.2.1 M13-Bakteriophage

Als Bakteriophagen werden Viren bezeichnet, die nur Bakterien als Wirtsspektrum haben. Der Bakteriophage (Phage) M13 gehört wie die Phagen f1 und fd zu den filamentösen Phagen. Der M13 ist ca.  $900 \times 7$  nm groß und in der Lage Bakterienzellen, die F-Pili ausbilden, zu infizieren und so sein ca. 6,5 kb zirkuläres Einzelstrang-DNA Genom in das Bakterium einzuschleusen. Durch den M13-Phagen werden die infizierten Bakterien nicht lysiert, sondern nur in ihrem Wachstum um ca. 50 % gehemmt (Webster, 2001). Auf dem Phagen genom sind insgesamt 11 Gene kodiert. Drei der Gene sind für die Replikation, drei für den Zusammenbau des Phagen und fünf für die Hüllproteine verantwortlich. Das mit ca. 2700 Kopien am häufigsten gebildete Protein je Phagenpartikel ist das Hüllprotein pVIII. Das Hüllprotein pIII liegt in drei bis fünffacher Kopie vor und liegt am Kopfende des Phagen (Abbildung 1.2) (Webster, 2001). Dieses Protein ermöglicht die Bindung des Phagenpartikels an den F-Pili der Bakterien und dessen Gen gIII kann bei der Konstruktion von Phagemidvektoren zur Fusion mit den Antikörperfragmenten verwendet werden.

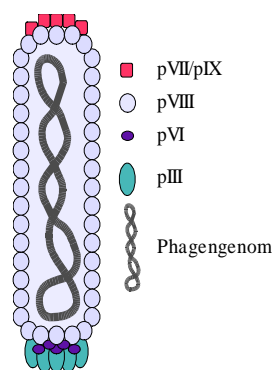


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des M13-Phagen

### 1.2.2 Antikörpergenbibliotheken

Antikörpergenbibliotheken enthalten die genetische Information einer Vielzahl von Antikörpern. Die genetische Information wird dabei aus isolierten B-Lymphozyten von einem oder mehreren humanen oder nicht humanen Spendern mittels PCR amplifiziert und in Phagemide kloniert (Abbildung 1.3). Je nach verwendetem Spenderrepertoire wird zwischen universellen Bibliotheken und Immunbibliotheken unterschieden (Hust et al. 2007a). Universelle Bibliotheken werden aus B-Lymphozyten von nicht immunisierten Spendern erzeugt. Da bei der Konstruktion auf das IgM-Genrepertoire zurückgegriffen wird, enthalten diese Bibliotheken

die genetische Information von Antikörpern gegen nahezu alle Antigene (Marks et al., 1991) (Griffiths et al., 1993). Immunbibliotheken hingegen werden aus bereits mit dem entsprechenden Antigen immunisierten Spendern gewonnen. Hierbei werden nicht IgM- sondern IgG-spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation der Genabschnitte verwendet (Clackson et al., 1991). Aus solchen Immunbibliotheken können bereits hochspezifische, *in vivo* affinitäts-gereifte Antikörper gegen das zur Immunisierung verwendete Antigen isoliert werden (Pelat et al., 2007).

Universelle Bibliotheken lassen sich in naive, semi-synthetische und synthetische Bibliotheken unterteilen. Naive Bibliotheken enthalten das Antikörpergenrepertoire in natürlicher, unveränderter Form. Semi-synthetische Bibliotheken sind so konstruiert, dass die Antikörpergene in bestimmten Bereichen randomisierte Sequenzen enthalten (Pini et al., 1998) (Hoo-genboom & Winter, 1992). Rein synthetische Bibliotheken bestehen aus einem festgelegten *framework* und vollständig randomisierten CDR-Bereichen (Knappik et al., 2000).

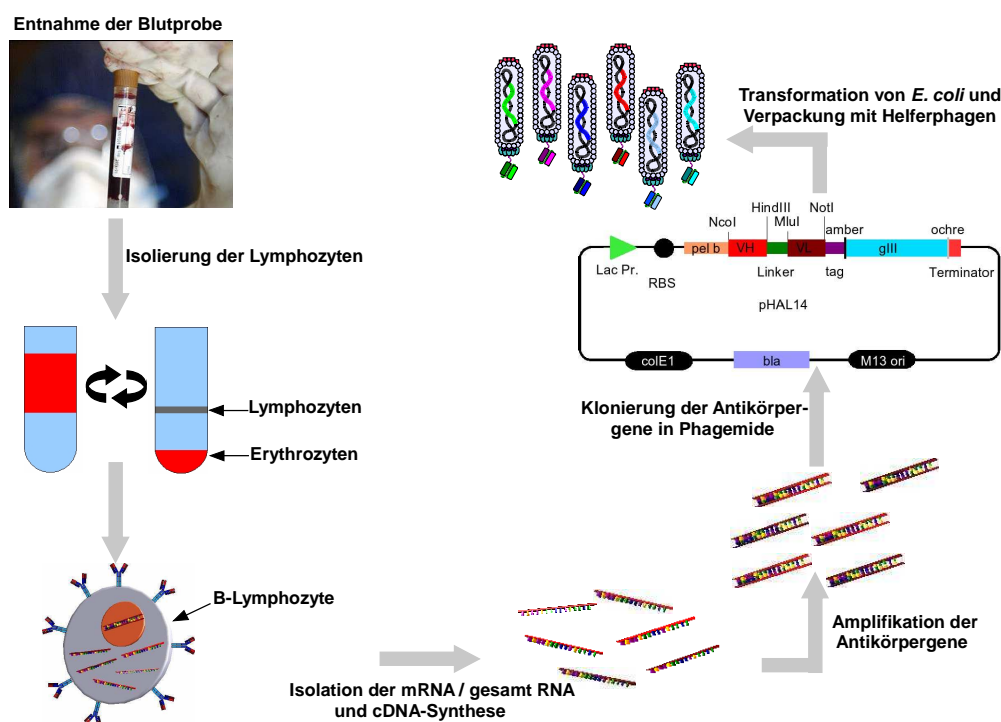


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Erstellung einer Antikörpergenbibliothek

### 1.2.3 Phagen-Display-Technologie

Das Prinzip des Phagen-Displays beruht auf der Kopplung von Genotyp und Phänotyp. Smith (Smith, 1985) fusionierte eine Restriktionendonuklease mit dem pIII-Hüllprotein von M13. Im weiteren Entwicklungsverlauf wurden mittels Fusion an das pIII-Protein auch Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Phagen präsentiert (McCafferty et al., 1990) (Breitling et al., 1991). Das Hüllprotein pIII erwies sich von den Capsidproteinen am besten geeignet. Da das Einbringen von zusätzlicher genetischer Information, z. B. Gene für Antikörperfragmente, in das Phagen genom einen Selektionsnachteil für die entsprechenden Phagen darstellt, wurde dazu übergegangen Phagemidvektoren (Abbildung 1.3) zu verwenden (Barbas et al., 1991), (Breitling et al., 1991), (Hoogenboom et al., 1991). Diese Phagemidvektoren enthalten die genetische Information der Antikörperfragment-pIII-Fusion, einen Selektionsmarker und die für *E. coli* und M13 notwendigen Replikationsursprünge. Um die Anreicherung von *non-sense*-Mutationen zu verringern, steht die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (Breitling & S Dübel, 1997). In den meisten Fällen wird der LacZ-Promotor verwendet. Für die Verpackung der Phagemide muss eine zweite Infektion mit einem Helferphagen, der die nötigen genetischen Informationen für die Phagenreplikation und Verpackung mitbringt, erfolgen. Das einzelsträngige Phagemid wird in die Phagenpartikel verpackt und das Fusionsprotein aus Antikörperfragment und pIII auf der Oberfläche präsentiert (Abbildung 1.4). Die Anzahl der präsentierten Antikörperfragmente lässt sich durch verschiedene Helferphagen modifizieren. Während bei der Verwendung des M13-Phagen eine monovalente Präsentation erzielt wird (Vieira & Messing, 1987a) und (Chasteen et al., 2006), kommt es bei der Verwendung des modifizierten Helferphagen Hyperphage zu einer multivalenten Präsentation des Antikörperfragments auf der Phagenoberfläche (Rondot et al., 2001), (Soltes et al., 2007).

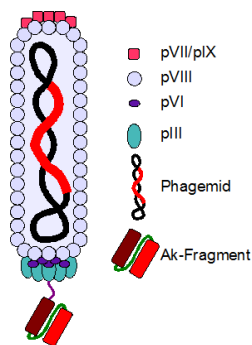
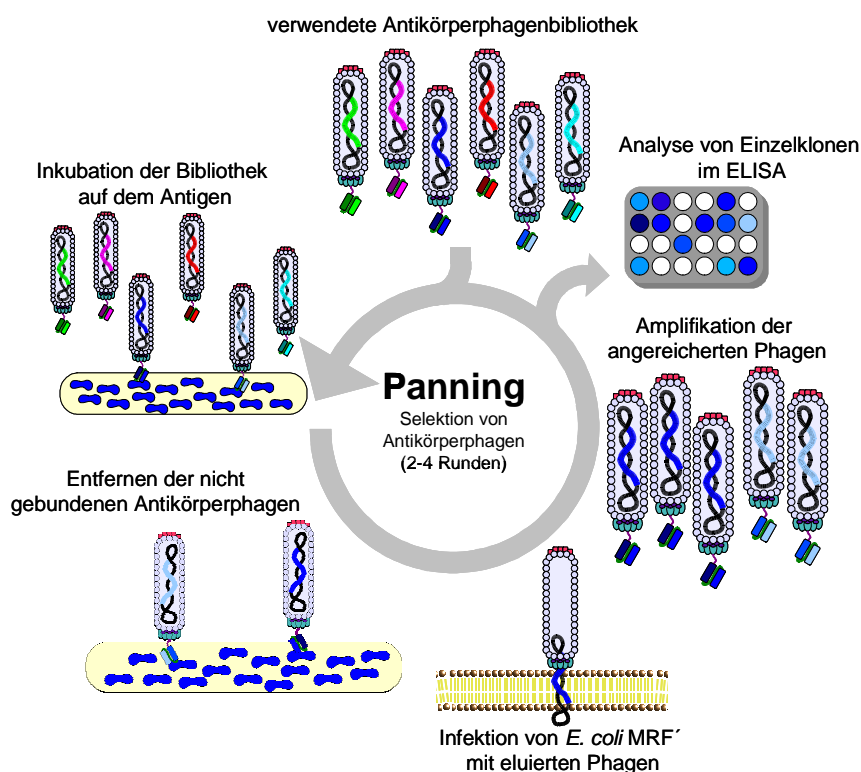


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines M13-scFv-Phagen

Die Antikörperphagen können für die Selektion von spezifisch bindenden Antikörperfragmenten eingesetzt werden. Die Technologie der Selektion von Antikörperphagen mittels Phagen-Displays wird auch als Panning bezeichnet (Parmley & Smith, 1988).

Für die Selektion von spezifischen Antikörperfragmenten wird das gewünschte Antigen an eine Mikrotiterplatte (Barbas et al., 1991), an magnetische Partikel (Hawkins et al., 1992) oder in Immunoröhrchen (Hust et al., 2002) gekoppelt. Auf dem Antigen wird anschließend die Antikörperphagen-Bibliothek inkubiert und nicht gebundene Phagen in mehreren Waschschritten entfernt. Anschließend können spezifisch gebundene Phagen mittels pH-Verschiebung oder Trypsinierung eluiert werden. Die eluierten Phagen werden zur Infektion von *E. coli*-Zellen verwendet und nach erfolgter Hyperinfektion mit einem Helferphagen werden neue Phagenantikörper produziert (Abbildung 1.5). Diese Phagenantikörper werden für eine erneute Selektionsrunde eingesetzt. Nach zwei bis vier Selektionsrunden werden Einzelklone auf Produktion spezifischer Antikörperfragmente untersucht. Da beim Phagen-Display gleichzeitig die Gensequenz isoliert wird, können die gewonnenen Antikörperfragmente anschließend in andere Antikörperformate oder alternative Expressionvektoren kloniert werden.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung einer Selektion von spezifischen Antikörperphagen aus einer Antikörperphagenbibliothek

### 1.2.4 Affinitätsreifung rekombinanter Antikörperfragmente

Die Affinitätsreifung ist eine gängige Verfahrensweise zur Verbesserung der Affinität von rekombinanten Antikörpern. Für die Affinitätsreifung stehen mehrere Technologien zur Verfügung. Es können gezielt einzelne oder randomisiert Mutationen eingefügt werden (Alvi et al., 2003), (Alzari et al., 1990), (Hawkins et al., 1992). Eine Methode der Zufallsmutagenese ist die Verwendung von *E. coli*-Mutatorstämmen. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, Mutationen in die Genabschnitte der Antikörperfragmente einzufügen, ohne zusätzliche Transformationen durchzuführen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Mutationen nicht nur den Genabschnitt des Antikörperfragments betreffen, sondern sich über das gesamte Bakteriengenom verteilen und somit auch essentielle Proteine des Wirtsbakterium und der Expressionsvektor selbst betroffen sein können (Low et al., 1996), (Irving et al., 1996), (Coia et al., 2001), (Nguyen & Daugherty, 2003).

Eine andere Methode der Mutagenese der Gensequenz des Antikörperfragments ist die *error-prone*-PCR. Bei dieser Methode werden die Gensequenzen in mehreren PCR-Runden mit flankierenden Oligonukleotiden und durch die Verwendung spezieller Polymerasen mit hoher Fehlerrate amplifiziert. Dabei sind bis zu 50 Punktmutationen pro 1 kb möglich (Graff et al., 2004). Nach der Mutagenisierung der Genabschnitte werden neue Antikörpergenbibliotheken erzeugt. In diesem Schritt liegt auch der Nachteil der PCR-Methode, da durch die Transformationseffizienz die Komplexität der Bibliotheken beschränkt wird. Da in den meisten Fällen bereits spezifisch bindende Antikörperfragmente mutagenisiert werden, ist die Komplexität in diesem Schritt nicht so essentiell wie bei der Erzeugung von universellen Antikörpergenbibliotheken. Nach der Erzeugung der randomisierten Bibliotheken werden mittels Panning und entsprechenden Selektionsbedingungen affinitätsgereifte Antikörperfragmente isoliert (Hust et al., 2007b)

Eine weitere Möglichkeit der Affinitätsreifung von Antikörperfragmenten ist das so genannte *chain-shuffling*, bei der die komplette leichte Kette  $V_L$  oder die komplette schwere Kette  $V_H$  des Antikörperfragments gegen ein universelles Antikörpergenrepertoire ausgetauscht wird (Marks et al., 1992), (Park et al., 2000).



### 1.2.5 Isolierung von *Salmonella*- und *Campylobacter*-spezifischer Antikörper

In der Literatur sind viele wissenschaftliche Arbeiten zur Isolierung von Antikörpern gegen *Salmonellen* beschrieben. Monoklonale Antikörper werden dabei durch die Immunisierung von Mäusen und der anschließenden Selektion von Hybridomzellen gewonnen. Kissel und Kollegen (1994) generierten 16 monoklonale Antikörper gegen ein 36 kDa großes Porin von *Salmonella* Typhi, indem sie das Protein rekombinant in *E. coli* produzierten und die aufgereinigte Proteinfraction dazu nutzten BALB/c-Mäuse zu immunisieren. Singh und Kollegen (1992a) immunisierten ebenfalls BALB/c Mäuse und generierten 41 monoklonale Antikörper gegen Porine. Im Unterschied zu Kissel wurden die Porine nicht rekombinant in *E. coli* produziert, sondern direkt aus *Salmonella* Typhimurium isoliert. Die Isolierung von humanen, monoklonalen Antikörpernfragmenten mittels Phagen-Display wurde bislang nicht beschrieben. Deng und Kollegen (1994) untersuchten mittels Phagen-Display die Präsentation und die veränderten Bindungseigenschaften eines auf dem murinen monoklonalen Antikörpers Se155-4 basierenden scFv, dessen Gen mittels *error-prone*-PCR randomisiert wurde. Der Antikörper Se155-4 ist spezifisch für *Salmonella* Serogruppe B o-Polysaccharide.

Die für *Campylobacter spec.* in der Literatur beschriebenen Antikörper wurden ebenfalls durch Immunisierung von Mäusen erzeugt. Es wurden unterschiedliche Immunisierungsstrategien mit verschiedenen Antigenen verfolgt. Für die Immunisierungen wurden Bakteriensuspensionen (Kosunen et al., 1984), Flagellin (Nachamkin & Hart, 1986), gereinigte Proteinfractionen (Brooks et al., 1995) und rekombinant in *E. coli* produziertes *major outer membrane protein* (Momp) von *Campylobacter jejuni* (Qian et al., 2008) verwendet. Bisher wurden keine humanen, monoklonalen Antikörperfragmente mittels Phagen-Display generiert.

## 1.3 *Salmonellen* und *Campylobacter* als Auslöser von Zoonosen

*Salmonellen* und *Campylobacter* sind weltweit die Ursache von lebensmittelbedingten Infektionskrankheiten, die je nach körperlicher Verfassung der Betroffenen auch bis zum Tode führen können. Schweinefleisch gilt dabei als eine der Hauptinfektionsquellen in Industrieländern. Das Robert Koch Institut (RKI) meldete für 2007 bis zur 49. Kalenderwoche 53.490 Salmonellosen in Deutschland. Im gleichen Zeitraum des Vorjahres wurden 50.470 Fälle gemeldet. Das entspricht einer Steigerung von ca. 6 % (RKI, 2007).

*Campylobacter spec.* werden in Deutschland ein immer wichtigerer Auslöser von Zoonosen. Mit 63.399 Fällen für das Jahr 2007 bis zur 49. Kalenderwoche überstieg die Zahl der Infektionen die Vorjahreszahl von 49.346 um ca. 28 %. Sie lösten damit die Salmonellen als wichtigsten Enteritiserreger ab. Bei der Untersuchung von infizierten Masthähnchenbeständen wurde, wenn eine Speziesbestimmung erfolgte, in 58,5 % der Fälle *C. jejuni* und in 41,5 % *C. coli* isoliert (RKI, 2007).

Die Diagnostik von Zoonosen bereits im Mastbetrieb stellt ein wichtiges Instrument zur Vergrößerung der Verbrauchersicherheit dar. Für die Vielzahl von Proben und den Zeitdruck, der bei Mast- und Schlachtbetrieben besteht, sind schnelle, verlässliche und hochdurchsatzfähige diagnostische Verfahren nötig.

### 1.4 *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serotyp Typhimurium

Salmonellen sind eine seit über 100 Jahren bekannte Gattung, der Familie der *Enterobacteriaceae*. *Salmonella* Typhi wurde bereits 1880 von Eberth mikroskopisch bestimmt. Salmonellen sind 0,7-1,5 x 2,0-5,0 µm große, Gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen. Die meisten Salmonellen sind durch eine peritriche Begeißelung beweglich (Rolle & Mayr, 2002). Der eigentliche Gattungsname wurde von Lignieres und Salmon geprägt. Alle Gram-negativen Bakterien besitzen eine innere und eine äußere Membran. Zusätzlich ist die äußere Membran von einer Lipopolysaccharidschicht (LPS) umgeben. Das LPS ist durch das Lipid A in der äußeren Membran verankert. Dieser Lipidanker ist toxisch und wird auch als Endotoxin beschrieben (Shands et al., 1974), (Selbitz et al., 1995). Endotoxine werden bei der Zelllyse freigegeben und können Fieber und Entzündungsreaktionen auslösen. Neben dem Lipid A besteht die LPS-Schicht aus einer aus Zuckerketten aufgebauten Kernregion und einer hochvariablen Sequenz von Oligosaccharideinheiten, die als O-Antigen bezeichnet wird (Selbitz & Bispin, 1995). Eine weitere antigene Struktur auf der Oberfläche von Salmonellen sind die Geißeln, die auch als H-Antigen bezeichnet werden. Anhand dieser O- und H-Antigene wurden die Salmonellen in verschiedene Serotypen eingeteilt. Kauffmann (1966) teilte die Salmonellen noch nach dem Prinzip „ein Serotyp – eine Art“ ein. Diese Einteilung führte zu über 2400 verschiedenen Salmonellenspezies. Erst Crosa und Kollegen (1973) definierte mit Hilfe von DNA-DNA Hybridisierungsversuchen die Einteilung der Salmonellen in die Spezies *Salmonella enterica*, die wiederum in 6 Subspezies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* und *indica* unterteilt ist. Die einzelnen Subspezies sind weiterhin in verschiedene

Serotypen aufgeteilt. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ist mit ca. 1400 Serotypen die größte Gruppe. Eine weitere Salmonellenspezies ist *Salmonella bongori*, die allerdings nur eine Subspezies *bongori* mit 20 verschiedenen Serotypen enthält (Reeves et al., 1989) und (Rolle & Mayr, 2002).

**Tabelle 1.1: Übersicht über die Gattung *Salmonella* (Rolle & Mayr, 2002)**

Spezies	<i>Salmonella enterica</i>						<i>Salmonella bongori</i>
<b>Supspezies</b>	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	<i>bongori</i>
<b>Serovare</b>	1405	471	94	311	65	10	19

*Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serotyp Typhimurium ist bei Zoonosen der am häufigsten zu findende Serotyp. Zur Vereinfachung der Bezeichnung von Salmonellen wurde sich darauf geeinigt nur die Spezies- und Serotypenbezeichnung zu verwenden. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serotyp Typhimurium wird somit zu *Salmonella* Typhimurium.

#### 1.4.1 Pathogenität und Virulenz von Salmonellen

Die Pathogenität ist ein speziesspezifisches, qualitatives Merkmal. Eine Bakterienart wird dabei als pathogen oder apathogen eingestuft. Die quantitative Ausprägung der Pathogenität wird bei dem jeweiligen Erregerstamm als Virulenz bezeichnet (Selbitz et al., 1995). Salmonelleninfektionen können zwei unterschiedliche Ausprägungen aufzeigen. Sie verlaufen entweder latent als lokale gastroenteritische, oder als septikämische Allgemeininfektion. Salmonellen sind mit ihren Fimbrien in der Lage sich an Zellen des Darmepithels anzuheften. Dieser Anheftungsprozess ist der erste Pathogenitätsschritt. Anschließend sind invasive Salmonellen in der Lage in die Epithelzellen einzudringen und sich über das Lymphsystem zu verbreiten. Weitere Virulenzfaktoren sind die Endo- und Enterotoxine der Salmonellen, die einen entscheidenden Anteil an der Virulenzausprägung haben. Ein Teil der Toxine wird erst durch die Lyse der Zellen freigesetzt und führt dann bei den infizierten Tieren bzw. Menschen zu massiven Fieberschüben (Selbitz et al., 1995), (Rolle & Mayr, 2002).

Salmonellen haben ein sehr breit gefächertes Wirtsspektrum und kommen in allen Säugetieren, Reptilien und Amphibien vor. Unter den Salmonellen gibt es Serovaren, die wirtsadaptiert oder nicht-wirtsadaptiert sind. Wirtsadaptierte Serovaren führen in den meisten Fällen nur bei dem entsprechenden Wirt zur Ausprägung von Symptomen. *Salmonella Gallinarum* ist bei-

spielsweise an Hühnervögel adaptiert und Infektionen beim Menschen treten eher selten auf. *Salmonella* Dublin ist an das Rind adaptiert, allerdings treten auch beim Menschen teilweise schwere Erkrankungen auf. *Salmonella* Typhimurium ist ein nicht-wirtsadaptierter Serovar und wird bei vielen Tierarten und auch beim Menschen gefunden (Selbitz et al., 1995). Dieser Serovar wird am häufigsten isoliert, und führt beim Menschen zum Teil zu schweren Krankheitssymptomen. Beim Schwein hingegen kommt es nur selten zur Ausprägung von Symptomen, was eine einfache Diagnostik unmöglich macht.

Die Problematik, die in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund rückt, ist die multiple Resistenz der Salmonellen gegen verschiedene Antibiotika. Der bei Schweinen dominierende Serotyp *Salmonella* Typhimurium Lysotyp DT104 wies 2002 in über 95 % eine fünffache (teilweise sogar zwölffache) Resistenz gegenüber Antibiotika auf. Diese Resistenzentwicklung entwickelt sich dahin, dass 2004 nahezu 100 % der Isolate multiresistent gegen 17 getestete antimikrobielle Substanzen waren (BfR, 2008).



**Abbildung 1.6: *Salmonella* Typhimurium**

Eingefärbte elektronenmikroskopische Aufnahme von *Salmonella* Typhimurium (rot), die in humane Zellen eindringen. (Webpage Illinois Department of public health: [www.idph.state.il.us](http://www.idph.state.il.us))

### 1.4.2 Diagnostik von Salmonellen

Die Diagnostik von Salmonellen und Salmonelleninfektionen geschieht heutzutage über zwei Wege. Eine Möglichkeit des direkten Erregernachweises ist die Diagnostik mittels Selektionskulturen, PCR oder markierter DNA-Sonden. Eine andere Möglichkeit der Diagnostik ist der immunologische Nachweis, der über  $\alpha$ -*Salmonella*-Antikörper des Wirtes geführt wird.

### 1.4.3 Direkter Nachweis

Für den direkten Erregernachweis bei lebensmittelbedingten Infektionen gibt es in Deutschland eine Reihe von Vorschriften, die in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch Nr. L 00.00.20 und Nr. L 00.00.20a zusammengefasst sind. Bei dem direkten Nachweis findet in der Regel eine Voranreicherung in nicht selektivem Medium statt. Nach der Voranreicherung werden die Proben auf Selektivnährböden ausgestrichen. Die Selektivnährböden fördern das Wachstum der Salmonellen, hemmen gleichzeitig aber die Begleitflora. Je nach zu erwartender Begleitflora sind unterschiedliche Selektivmedien zu verwenden. Proben mit zu erwartender hoher Begleitflora wie Kotproben oder Abstriche müssen auf stärkeren Selektivmedien als z. B. Lebensmittelproben kultiviert werden (Bockemühl, 1992). Die Problematik des kulturellen Erregernachweis ist die zeit- und kostenintensive Anzucht der Salmonellen. Ein Überblick über den Umfang dieser Diagnostikmethode gibt Abbildung 1.7.

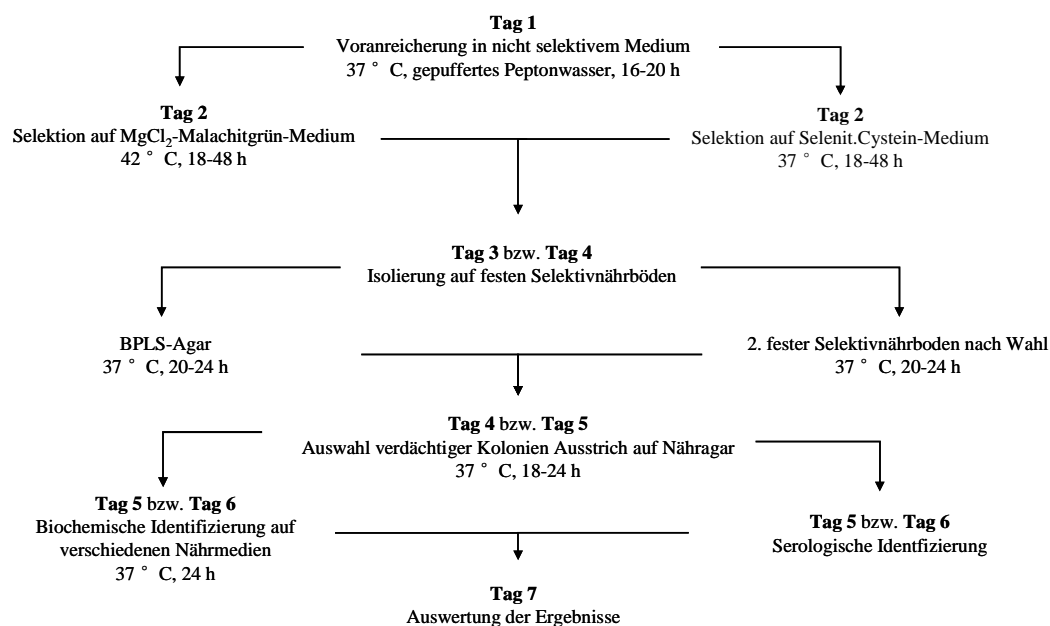


Abbildung 1.7: Nachweis von Salmonellen nach L00.00.20 §64 LFGB

Eine weitere Möglichkeit der Salmonellen-Diagnostik ist die Verwendung von Gensonden. Die erste für die Diagnostik geeignete Gensonde war ein Genfragment von *Salmonella* Typhimurium (Fitts et al., 1983). Mittlerweile existieren auch Nucleinsäure-Sonden, die in der Gegenwart von komplementärer RNA stark fluoreszieren und somit die Diagnostik von Salmonellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen. Die Sonden ermöglichen ver-

schiedene Bakterien anhand geringer Unterschiede in der Sequenz ihrer 16s RNA zu unterscheiden (Silverman & Kool, 2005). Neben der Diagnostik mit Gensonden wird die PCR zum diagnostischen Nachweis von Salmonellen eingesetzt. Mittlerweile existieren verschiedene Oligonukleotidzusammenstellungen, um unterschiedliche Ansprüche in der Diagnostik abzudecken (Aabo et al., 1993), (Alvarez et al., 2004). Bei der Diagnostik mittels Gensonde oder PCR ist oftmals eine Voranreicherung notwendig. Die zeitaufwändige Kultivierung auf Selektivnährböden wird dabei umgangen. Ein Nachteil des direkten Erregernachweises ist die diskontinuierliche Ausscheidung von latent infizierten Salmonellenträgern, die eine Erkennung der Infektion oftmals nicht zulässt. Eine Voranreicherung ist dabei unumgänglich. Außerdem sind die Art der Probennahme, der Transport und die Bearbeitung des Probenmaterials entscheidend für eine erfolgreiche Diagnostik (Selbitz et al., 1995).

### 1.4.3.1. Indirekter Nachweis

Der indirekte Erregernachweis findet über die im Serum oder Fleischsaft enthaltenen Antikörper des Wirts statt. Der Vorteil des indirekten Nachweises ist, dass Tierbestände lückenlos untersucht werden können und die Problematik der diskontinuierlichen Erregerausscheidung umgangen wird. Die Antikörper können auch noch Wochen nach einer überstandenen Salmonelleninfektion nachgewiesen werden (Kramer et al., 1999). Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die große Probenzahl, die in kurzer Zeit bearbeitet werden kann und somit für den Einsatz in der Nutztierhaltung und Fleischgewinnung geeignet ist. Eine Voranreicherung ist nicht mehr nötig.

In Deutschland sind mittlerweile mehrere nicht kompetitive ELISA-Testsysteme erhältlich. Der so genannte Mix-ELISA, der SALMOTYP®-Fleischsaft-ELISA und der Enterisol®-ELISA. Diese ELISA-Systeme verwenden Salmonellen-spezifische O-Antigene. Der Mix-ELISA ist ein nicht kommerzieller ELISA, der nach der Vorschrift des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin durchgeführt wird. Er beruht auf dem von Nielsen und Kollegen (1995) entwickelten „dänischen ELISA“. In diesem ELISA werden die O-Antigene 1, 4, 5 und 12 von *Salmonella* Typhimurium und die O-Antigene 6 und 7 von *Salmonella* Cholerasuis als Antigen eingesetzt. Der SALMOTYP®-Fleischsaft-ELISA und auch der Enterisol®-ELISA basieren auf dem gleichen Testsystem, allerdings handelt es sich hierbei um einen kommerziellen, standardisierten ELISA der Labor Diagnostik GmbH (Leipzig) bzw. Boehringer Ingelheim. Da die Antikörper im Serum bzw. Fleisch-

saft auch nach überstandener Infektion noch nachweisbar sind, können diese ELISA-Nachweissysteme nicht für die Bestimmung der aktuellen Salmonellenbelastung eingesetzt werden. Sie können aber genutzt werden, eine Aussage über die generelle Salmonellenbelastung und Prävalenz von Salmonellen innerhalb eines Mastbetriebes zu treffen. Das Bundesamt für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz hat mit der Verordnung zur Verminderung der Salmonellenverbreitung durch Schlachtschweine die gesetzliche Grundlage für eine flächendeckende Bestandsüberwachung geschaffen. Die Überwachung ist aufgrund der hohen Probenzahl nur mit Hilfe der ELISA-Technik möglich. (Nielsen et al., 1995), (Steinbach & Staak, 2001).

#### **1.4.4 Outer membrane protein D (OmpD)**

*Salmonella* Typhimurium gehört zu den Gram-negativen Bakterien und besitzt somit eine äußere Membran. In die äußere Membran ist eine Vielzahl von Proteinen eingebettet, die *outer membrane proteins* (Omps). Einen Anteil dieser Proteine bilden wassergefüllte Porine, die für den Transport von niedermolekularen Substanzen zuständig sind (Nikaido, 1994). Das *outer membrane protein D* (OmpD) ist ein ca. 34 kDa großes Porin und wird neben OmpF und OmpC von *Salmonella* Typhimurium exprimiert (Lee & Schnaitman, 1980), (Nikaido & Vaara, 1985), (Singh et al., 1992b). Das OmpD ist bis auf *Salmonella* Typhi spezifisch für *Salmonella spec.* (Santiviago et al., 2001) Es weist eine Homologie mit dem NmpC und Lc Porin von *E. coli* K-12 auf (Singh et al., 1992a).

OmpD macht einen Anteil von ca. 1 % der Gesamtproteinmenge einer Zelle aus (Santiviago et al., 2003) und spielt als Metabolitransporter z. B. eine Rolle bei der Resistenz gegen Methyl-Viologen (Santiviago et al., 2002). Die Bedeutung von OmpD bei der Infektion von Menschen bzw. Tieren ist nicht geklärt. Es ist eine OmpD-Mutante beschrieben, die in Bezug auf den Wildtyp eine verringerte Virulenz besitzt (Dorman et al., 1989). Andere konnten bei der Verwendung der gleichen Mutante keinen Unterschied in der Virulenz feststellen (Meyer et al., 1998) (Selke et al., 2007).

### **1.5 *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni***

Die Taxonomie von *Campylobacter spec.* ist umstrittener als die Einteilung von *Salmonella spec.*. Laut Kist (Kist, 1986) sprach bereits T. Escherich 1886 von nicht züchtbaren spiral-

förmigen Bakterien. Die vermutliche Erstbeschreibung geht auf McFadyen und Stockmann zurück, die 1909 vibrioähnliche Erreger isolierten. Levy beschrieb diese Vibrionen 1946 beim Menschen (Kist, 1986). Anhand von DNA-Untersuchungen (Bestimmung der Guanosin- und Cytosingehalte) wurde die vibrioähnliche Gruppe abgegrenzt und als *Campylobacter* bezeichnet (Sebald & Veron, 1963). Heute werden sie in die Klasse der *Epsilonproteobacteria*, der Ordnung *Campylobacteriales*, in die Familie der *Campylobacteriaceae* eingeordnet. In der Familie der *Campylobacteriaceae* sind die Gattungen *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* und *Thiovulum* zu finden. Derzeit werden 16 *Campylobacter* Spezies und 6 Subspezies unterschieden (Garrity et al., 2002). Die wichtigsten Vertreter sind *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni*, die für einen Großteil der durch *Campylobacter* verursachten Erkrankungen verantwortlich sind (Qian et al., 2008). Eine nahe verwandte Familie der *Campylobacteriaceae* ist die Familie der *Helicobacteriaceae*, die ebenfalls in die Ordnung der *Campylobacteriales* eingeteilt wird. Der bekannteste Vertreter der *Helicobacteriaceae* ist *Helicobacter pylori*, der in den 80er Jahren im Magen von Patienten nachgewiesen wurde (Marshall & Warren, 1984) und heute als Mitverursacher von Magengeschwüren gilt (Marshall & Windsor, 2005).

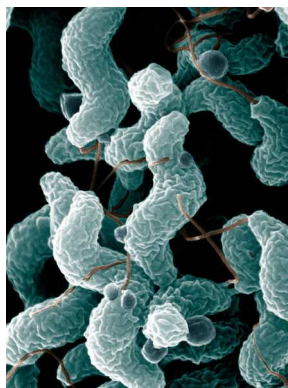
**Tabelle 1.2: Spezies und Subspezies der Gattung *Campylobacter* (Garrity, 2005)**

Spezies	Subspezies	Spezies	Subspezies
<i>C. coli</i>	---	<i>C. rectus</i>	---
<i>C. concisus</i>	---	<i>C. showae</i>	---
<i>C. curvus</i>	---	<i>C. sputorum</i>	---
<i>C. gracilis</i>	---	<i>C. upsaliensis</i>	---
<i>C. helveticus</i>	---	<i>C. lari</i>	---
<i>C. hominis</i>	---	<i>C. fetus</i>	<i>fetus</i> <i>venerealis</i>
<i>C. lari</i>	---	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>hyointestinalis</i> <i>lawsonii</i>
<i>C. mucosalis</i>	---	<i>C. jejuni</i>	<i>jejuni</i> <i>doylei</i>

*Campylobacter* sind wie Salmonellen Gram-negative, mikroaerophile, spiralig gewundene bis S-förmige Stäbchen. Sie sind 0,2-0,8 µm x 0,5-5,0 µm groß und besitzen meist polar oder bipolar ein Flagellum zur Fortbewegung. *Campylobacter* besitzen ein Temperaturoptimum im mesophilen Bereich von 30-37 °C. Es gibt allerdings auch thermophile *Campylobacter* wie



z.B. *C. jejuni* und *C. coli*, die ihr Wachstumsoptimum bei ca 42 °C besitzen (Penner, 1991). Diese Eigenschaft wird auch zur Selektivanreicherung von den genannten *Campylobacter*-spezies genutzt.



**Abbildung 1.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Campylobacter jejuni***  
(Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture: [www.ars.usda.gov/main/main.htm](http://www.ars.usda.gov/main/main.htm))

### 1.5.1 Pathogenität und Virulenz von *Campylobacter spec.*

Der Pathogenitätsmechanismus für *Campylobacter spec.* ist bislang nicht völlig aufgeklärt und es ist kein adäquates Tiermodell zur Untersuchung vorhanden (Garrity, 2005). Für die Infektion von Säugetieren dürften ähnliche Mechanismen wie bei *Salmonella spec.* gelten. Es konnte gezeigt werden, dass Flagellin (Nachamkin & Hart, 1986), O-Antigene (Brooks et al., 2001) oder Membranproteine (Blaser et al., 1984) von *Campylobacter spec.* immunogene Wirkung aufweisen. Die Symptome einer Campylobacterinfektion entsprechen denen einer klassischen Gastroenteritis und sind ohne nähere Diagnostik nicht von Salmonellosen zu unterscheiden. Die Gefahr bei Campylobacterinfektionen liegt in der, im Vergleich zu Salmonellen, sehr geringen Infektionsdosis von ca. 500 Keimen (Robinson, 1981). Campylobacterinfektionen beim Menschen sind in Deutschland wie Salmonellosen meldepflichtig. Eine folgenschwere, wenn auch sehr seltene Erkrankung, die nach einer Infektion mit *C. jejuni*, auftreten kann ist das Guillain-Barré-Syndrom. Bei dieser Erkrankung kommt es zur Entzündung der Nervenwurzeln oder der Nervenscheide des Rückenmarks und der peripheren Nerven, die zu Lähmungen der Arme und Beine bis hin zu Atemlähmungen führen kann (Nachamkin et al., 1998).

### 1.5.2 Diagnostik von *Campylobacter spec.*

Der Nachweis von *Campylobacter spec.* besitzt nicht den gleichen Standard wie die Diagnostik von *Salmonella spec.* Die meisten Labore verwenden biochemische Verfahren zum Nachweis von *Campylobacter spec.* (Vandamme & Goossens, 1992). Jedoch werden immer häufiger auch Schnellverfahren wie PCR oder ELISA zur Diagnostik eingesetzt. Die klassischen, kulturellen Diagnostikverfahren orientieren sich an der ISO-Norm 10272. Die etwas abgeänderte Version ISO 10272/1 ist seit April 2006 gültig (BfR, 2008). Nach einer Voranreicherung der zu untersuchenden Probe, z. B. in Preston-Bouillion oder Bolton-Bouillion, findet ein kultureller Nachweis auf Selektivnährböden wie Skirrow-Agar (Skirrow, 1977), mCCDA (Bolton et al., 1984) oder Karmali-Agar (Karmali et al., 1986) statt. Eine Voranreicherung bei 41,5 °C erwies sich für den Nachweis von thermophilen *Campylobacter* und zur Unterdrückung der Begleitflora als optimal. Ein zusätzlicher Schritt zur selektiven Anreicherung von *Campylobacter* ist die Membranfiltermethode, bei der die Voranreicherungen durch eine 0,45-0,65 µm Cellulose-Acetat-Membran filtriert werden (Steele & McDermott, 1984), (Engberg et al., 2000).

Neben den klassischen Nachweisverfahren wurden eine Reihe weiterer Verfahren wie PCR oder auch ELISA in verschiedenen Arbeitsgruppen entwickelt. Bei den PCR-Methoden hat sich laut Bundesinstitut für Risikobewertung die Lightcycler-Real-Time-PCR (Perelle et al., 2004) als am effektivsten herausgestellt. Auch eine Multiplex-PCR (Denis et al., 1999) wurde entwickelt, zeigte jedoch je nach Probenvorbereitung eine große Anfälligkeit der Nachweis-sensitivität (BfR, 2008). ELISA-Verfahren wurden beispielweise von Dediste und Kollegen (2003) oder Notermans und Wernars (1991) entwickelt, die auf dem Nachweis von Toxinen bzw. Metaboliten der Bakterien beruhen und die entsprechenden Antikörper zum Nachweis einsetzen.

Auf dem Markt sind auch kommerzielle Diagnostik-Kits vorhanden. Von bioMérieux ist das VIDAS<sup>®</sup>-*Campylobacter*, von VWR der Singlepath<sup>®</sup>-*Campylobacter* GLISA als immunologische Nachweisverfahren oder von BioControl Systems das Probelia PCR-System als molekulares Nachweisverfahren erhältlich.

### 1.5.3 *Major outer membrane protein von C. coli und C. jejuni*

Wie Salmonellen besitzen auch *Campylobacter* als Gram-negative Bakterien eine innere und eine äußere Zellmembran. In der äußeren Membran ist eine Vielzahl von Proteinen lokalisiert. Eine Gruppe dieser Proteine sind die Porine, die die Permeabilität der Membran für niedermolekulare Moleküle regulieren (Buchanan, 1999), (Schirmer, 1998). Die häufigsten Proteine werden auch als *major outer membrane protein* (Momp) bezeichnet. Momp von *C. jejuni* (MompJ) kann in drei verschiedenen Konformationen isoliert werden: Die gefaltete Form mit ca. 35 kDa, die denaturierte, monomere Form mit 40-48 kDa und das native Trimer mit 120-140 kDa (Huyer et al., 1986) (Zhang et al., 2000). Die monomere Form besteht aus 18  $\beta$ -Faltblättern, die durch  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden sind und so das eigentliche Porin bilden (Zhang et al., 2000). Die Expression dieser Porine scheint sowohl pH- als auch temperaturabhängig zu sein. Dedieu (Dedieu et al., 2002) beobachtete eine verstärkte Expression bei 42 °C und pH 8,5. Bei 31°C und pH 5,5 nahm die Expression von MompJ ab. Die Immunogenität von MompJ konnte nachgewiesen werden (Blaser et al., 1984), (Nachamkin & Hart, 1985). Qian und Kollegen (2008) isolierte einen monoklonalen Antikörper aus Mäusen nach der Immunisierung mit rekombinantem MompJ. Obwohl Publikationen sich hauptsächlich mit der Untersuchung von Momp aus *C. jejuni* beschäftigten, dürften für das *major outer membrane protein* von *C. coli* aufgrund der hohen Homologie ähnliche Charakteristika zutreffend sein.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung von Antikörperfragmenten aus humanen, naiven Antikörpergenbibliotheken, die gegen Membranproteine von *Salmonella spec.* und *Campylobacter spec.* gerichtet sind. Nach der Isolierung durch optimierte Panningverfahren sollen diese Antikörperfragmente produziert und eingehend charakterisiert werden. Hierbei sollen insbesondere die Bindungseigenschaften dahingehend untersucht werden, ob ein kompetitiver ELISA zur Zoonose-Diagnostik etabliert werden kann. Ein solches Verfahren hat gegenüber den etablierten diagnostischen Methoden den Vorteil, dass die Serumantikörper des Wirtes indirekt nachgewiesen werden und somit ein tierartübergreifender ELISA angeboten werden kann.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Chelating Sepharose FF	GE Healthcare, München
CM5-Chip	GE Healthcare, München
Dialyseanschlauch 12-14 kDa Ausschluss	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegimpfösen	VWR, Darmstadt
Einwegspatel	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvetten 1 mm	Bio-Rad, München
Filterpapier	Bio-Rad, München
Filter (0,8 µm; 0,45 µm; 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Mikroschraubröhrchen (2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
MTP 96 Well Polypropylen	Greiner bio-one, Frickenhausen
MTP 96 Well Polystyrol Maxisorp	Nunc, Wiesbaden
MTP 96 Well Polystyrol Polysorp	Nunc, Wiesbaden
MTP-Abdeckfolie (AeraSeal, SealPlate)	Excel Scientific, Wrightwood USA
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen (7 cm; 15 cm)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen (mit Filter)	Greiner bio-one, Frickenhausen
PVDF-Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (15 mL; 50 mL)	Greiner bio-one, Frickenhausen

#### 2.1.2 Geräte

Tabelle 2.2: verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Agarosegelkammer	Perfect Blue	PeqLab, Erlangen
Blot-Apparatur	TransBlot SD	Bio-Rad, München
Chromatographieranlage	ÄKTA-Purifier	GE Healthcare, München
Chromatographiesäule	Superdex200 HiLoad 16/60 Superdex75 10/300 GL	GE Healthcare, München
Elektrophoresekammer	Miniprotean 3 cell	Bio-Rad, München
ELISA-Reader	Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen

Gerät	Typ	Hersteller
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Typ BE400	Memmert, Schwabach
Mischgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York
MTP-Schüttelinkubatoren	Thermo Shaker PST-60H-4	Lab4you, Berlin
Netzgerät	EPS 301	GE Healthcare, München
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	Arium 611	Sartorius, Göttingen
Pipettierhilfe	Acu-Jet	Brand, Wertheim
Schüttelinkubatoren	BS1 / BS4B	Braun, Melsungen
Sequenzierer	ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Spektrophotometer	ND1000	PeqLab, Erlangen
SPR-Messgerät	Biacore 2000	GE Healthcare
Sterilwerkbänke		
Thermocycler	DNA Engine	BioRad, München
Überkopfschüttler	Rotator	GKisker, Steinfurt
Waagen	Laboratory LC 6200 D	Sartorius, Göttingen
	E 1200 S	
	A120 S	
Zentrifugen	5414 D	Eppendorf, Hamburg
	5810 R	
	Biofuge fresco, Biofuge pico	Heraeus, Hanau
	Sorvall RC5, RC5B Plus, RC6 Plus	Thermo Scientific

### 2.1.3 Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Fluka/ Riedel-de-Haen) (Neu-Ulm), Carl Roth (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Frankfurt am Main) verwendet. Der Reinheitsgrad war immer p.a..

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen mit Reinstwasser angesetzt bzw. verdünnt.

Acetatpuffer pH 4,5

10 mM Natriumacetat  
(eingestellt mit 10 mM Essigsäure)

Acrylamid-Mix	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
APS	1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
BCIP-Lösung	15 g/L BCIP in DMF
Boratpuffer pH 8,5	6,2 g/L Borsäure (eingestellt mit NaOH)
Carbonatpuffer pH 9,7	35 mM NaHCO <sub>3</sub> 15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
CBS pH 7,0	8,0 g/L NaCl 0,2 g/L KCl 2,08 g/L Zitronensäure 1× H <sub>2</sub> O (eingestellt mit 1 M NaOH)
Coomassiefärbelösung	10 % Essigsäure 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassieentfärbelösung	10 % Essigsäure
EDC	75 g/L 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)- carbodiimid
Ethidiumbromidlösung	10 g/L Ethidiumbromid
Formiatpuffer pH 4,3	100 mM Natriumformiat (eingestellt mit Ameisensäure)
HCl/ Glycin pH 2,2	0,1 M Glycin
IMAC-Bindepuffer pH 7,4	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 10 mM Imidazol (8 M Harnstoff für denaturierende Bedingungen) (eingestellt mit NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
IMAC-Waschpuffer 1	IMAC Bindepuffer mit 20 mM Imidazol
IMAC-Waschpuffer 2	IMAC Bindepuffer mit 40 mM Imidazol
IMAC-Elutionspuffer	100 mM EDTA in PBS
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG
Laemmli-Ladepuffer 5×	500 g/L Glycerin 100 g/L SDS 250 mL β-Mercaptoethanol 200 mL 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,5 g/L Bromphenolblau
MPBS-T	2 % (w/v) Milchpulver in PBS-T
MTT-Lösung	50 g/L MTT in 70 % DMF + 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Natriumacetatlösung pH 5,2	3 M Natriumacetat

NBT-Lösung	30 g/L NBT in 70 % (v/v) DMF
NHS	11,5 g/L N-Hydroxysuccinimid
PBS pH 7,4	8,5 g/L NaCl 1,34 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,35 g/L NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-T	0,1 % Tween20 in PBS
PBS-T für ELISA-Washer	0,05 % Tween20 in PBS
PBS-T für SPR-Analyse	0,005 % Tween20 peroxidfrei in PBS
PDB pH 7,5	10 mM Tris 20 mM NaCl 2 mM EDTA
PEG/NaCl	20 % (w/v) PEG 6000 2,5 M NaCl
Plasmid-Präparationslösung S1 pH 8,0	100 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 µg/mL RNase A
Plasmid-Präparationslösung S2	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Plasmid-Präparationslösung S3 pH 5,5	3 M Kaliumacetat
2× RIPA pH 7,4	20 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 2% Sodiumdeoxycholat; 2% Igepal
Schockpuffer pH 8,0	20 % (w/v) Saccharose 50 mM Tris 1 mM EDTA
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Stopplösung für ELISA	0,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Strippingpuffer A	8 M Harnstoff 1 % (w/v) SDS 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Strippingpuffer B	10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) EtOH
Substratpuffer Immunostain pH 9,5	100 mM Tris 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>



TAE Puffer (1×) pH 8,0	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
TBS pH 7,2	10 mM Tris 150 mM NaCl (eingestellt mit HCl)
TET pH 8,0	100 mM Tris-HCl 50 mM EDTA 2% Triton-X100
TFB1 pH 5,8	10 mM Calciumchlorid 30 mM Kaliumacetat 100 mM Rubidiumchlorid 50 mM Manganchlorid 15 % (v/v) Glycerin (eingestellt mit Essigsäure)
TFB2 pH 8,0	10 mM Morpholinopropanesulfonic acid 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM Calciumchlorid 15 % (v/v) Glycerin
TBS-T	0,05 % Tween20 in TBS
TMB-Lösung A pH 4,1	30 mM Kaliumcitrat 1 % (w/v) Zitronensäure
TMB-Lösung B	10 mM Tetramethylbenzidin 80 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %) 10 % (v/v) Aceton 90 % (v/v) EtOH
Transferpuffer für Western-Blot	25 mM Tris 192 mM Glycin
Trypsinlösung	10 mg/L Trypsin in PBS

### 2.1.5 Nährmedien und Supplemente

Die Medien- und Supplementbestandteile wurden in Reinstwasser gelöst und anschließend autoklaviert. Die Antibiotika wurden sterilfiltriert und den Nährmedien nach dem Autoklavieren hinzugegeben.

2× YT-Flüssigmedium pH 7,0	1,6 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl
2× YT-Agar	2× YT-Flüssigmedium 1,5 % (w/v) Agar-Agar

2× YT-AK-Flüssigmedium	2× YT-Flüssigmedium 100 mg/L Ampicilin 50 mg/L Kanamycin
2× YT-GA-Flüssigmedium	2× YT-Flüssigmedium 100 mM Glukose 100 mg/L Ampicilin
2× YT-T-Flüssigmedium	2× YT-Flüssigmedium 50 mg/L Tetracyclin
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
SOC-Medium pH 7,0	2 % (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,05 % (w/v) NaCl 20 mM Mg <sup>2+</sup> -Lösung 20 mM Glukose
Mg <sup>2+</sup> -Lösung	1 M MgCl <sub>2</sub> 1 M MgSO <sub>4</sub>
Glukoselösung	2 M Glukose
Ampicillinstammlösung	100 g/L
Kanamycinstammlösung	50 g/L
Tetracyclinstammlösung	10 g/L in EtOH

### 2.1.6 Bakterienstämme und Bakteriophagen

Tabelle 2.3: verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	K12: $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ}\Delta\text{M15 Tn10 (Tetr)]}$	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	K12: F- $\text{mcrA } \Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC}) \phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15 } \Delta\text{lacX74 nupG recA1 araD139 } \Delta(\text{ara-leu})7697 \text{ galE15 galK16 rpsL(Str}^{\text{R}}) \text{ endA1 } \lambda^{-}$	Invitrogen
<i>Salmonella</i> Typhimurium 421/425	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Serotyp Typhimurium Lebendimpfstoff des lizenzierten Vakzin SALMOPORC®	IDT Dessau-Tornau
<i>Salmonella</i> Typhimurium $\Delta\text{ompD}$	<i>ompD</i> Negativmutante von <i>Salmonella</i> Typhimurium 421/425	Selke 2006
<i>Campylobacter coli</i>	DSM-Nummer 4689	DSMZ
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp <i>jejuni</i>	DSM-Nummer 4688	DSMZ
Helferphage Hyperphage	---	Progen Biotechnik
Helferphage M13K07	---	GE-Healthcare(Vieira & Messing, 1987b)

### 2.1.7 Plasmide

Tabelle 2.4: verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendungszweck
pHAL14	Phagemidvektor, Klonierung von Antikörpergenbibliotheken Phage Display
pOPE101-XP	Expressionsvektor, Produktion von scFv-Fragmenten
pGEX5x3	GST-Expressionsvektor
pTopo TrcHis	Klonierung und Expression von OmpD, MompC und MompJ
pSOM500	pGEX5x3 GST-OmpD Fusionsexpressionsvektor
pSOM500-His	pSOM500 mit zusätzlichen His-tag zur Aufreinigung mittels IMAC

### 2.1.8 Peptide

Die eingesetzten Peptide und Peptidmembranen wurden von der Abteilung Chemische Biologie des Helmholtz-Zentrum für Infektionsbiologie (Braunschweig) bezogen.

**Tabelle 2.5: verwendete Peptide**

Peptid	Aminosäuresequenz N'-C'
OmpD 1	Ac-YNKDGNKLDLYGKVVHAQHVFSC-amid
OmpD 2	Ac-DKTRLAFAGLKFADYGSFDYGC-amid
OmpD 3	Ac-FGLRPSAYLKSKGKNLGTYYGC-amid
OmpD 4	Ac-TFVDYKINLLDSDFTKAAKVC-amid

### 2.1.9 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Biomers.net (Ulm) synthetisiert

**Tabelle 2.6: verwendete Oligonukleotide**

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
MHgIII_r	cta aag ttt tgt cgt ctt tcc
MHLacZPro_f	ggc tcg tat gtt gtg tgg
MHColE1_f	ccc aat acg caa acc gcc
MHpOPE_f2	ctt aga ttc aat tgt gag cgg
MHpOPE_r2	ctg atc att agc aca ggc c
MKpelB_f	gcc tac ggc agc cgc tgg
MKmyc_r	gat cct ctt ctg aga tga g
TM HIS-seq-rev	tcc gct atc gct acg tga g
TM-pSOM500_fw	atc gga tct gat cga agg tcg tgg gat ccc
TM-pSOM500_His-rev	gcc gct cga gtc att agt gat ggt gat ggat gat gga act ggt agt tca gac caa cag caa cga tgt tgt cgg tag aca ct
TM-TOPOSeq_fw	gtg ggc act cga ccg gaa tt
TM-TOPOSeq_rev	ggg acc acc gcg cta ctg ccg cca ggc
HT-gIII-Beginn-1-rev	taa aca act ttc aac agt ttc agc t
lIB6-Aff-2-fwd	gcc gct ggc ttg ctg ctg ctg gca gct cag ccg gcc atg g
lIB6-Aff-2-rev	gtt ctg cgg ccc cgt gat ggt gat gat gat gag cgg ccg c

### 2.1.10 Enzyme

Tabelle 2.7: verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Combizyme DNA-Polymerase	Invitex, Berlin
Mutazyme II DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam NL
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma, München
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Shrimp alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin	Promega, Mannheim
	Sigma, München

### 2.1.11 Antikörper

Tabelle 2.8: verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Maus $\alpha$ -Lysozym D1.3 scFv (monoklonal)	AG Dübel, TU-Braunschweig
Maus $\alpha$ -pentaHis IgG (monoklonal)	Qiagen, Hilden
Maus $\alpha$ -c-myc 9E10, IgG (monoklonal)	AG Dübel, TU-Braunschweig
Ziege $\alpha$ -Maus IgG Fc spez. AP Konjugat (polyklonal)	Sigma-Aldrich, München
Ziege $\alpha$ -Maus IgG Fab spez. HRP Konjugat (polyklonal)	Sigma-Aldrich, München

### 2.1.12 Kit-Systeme

Tabelle 2.9: verwendete Kit-Systeme

Kit-System	Hersteller
Illustra <sup>TM</sup> GFX <sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare, München
Illustra <sup>TM</sup> GFX <sup>TM</sup> PCR and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
GenElute <sup>TM</sup> HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich, München
GeneMorph <sup>®</sup> II Random Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam NL
BigDey <sup>®</sup> Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Waltham USA
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren

### 2.1.13 Computerprogramme und Datenbanken

Tabelle 2.10: verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Programme / Datenbank	Anwendung / Anbieter
BIAevaluation 4.1	Auswertung SPR-Analysen, GE Healthcare
FinchTV 1.4.0	Auswertung von DNA Sequenzen, Geospiza Inc.
ImageJ 1.37	Proteinquantifizierung, <a href="http://rsb.info.nih.gov/jj/">http://rsb.info.nih.gov/jj/</a>
Office 2003	Protokolle, Zeichnungen, Grafiken, Präsentationen, Microsoft
Qtiplot 0.9.3	Diagramme, <a href="http://soft.proindependent.com/qtiplot.html">http://soft.proindependent.com/qtiplot.html</a>
Photoshop Elements	Bildbearbeitung, Adobe Systems
Unicorn 5.10	Chromatographieauswertung, GE Healthcare
Vector NTI 10.0	Plasmid-Verwaltung, Invitrogen, USA
MultAlin Interface	Sequenzvergleiche, <a href="http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html">http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html</a>
ClustalW	Sequenzvergleiche, <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a>
IMGT	Analyse von Antikörpersequenzen, <a href="http://imgt-cines.fr">http://imgt-cines.fr</a>
NCBI	Literatur, Protein- und Gensequenzen, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
VBASE2	Analyse von Antikörpersequenzen, <a href="http://www.vbase2.org">http://www.vbase2.org</a>

### 2.1.14 Sonstiges

Tabelle 2.11: zusätzliche Materialien

Produkt	Hersteller
DNA-Ladepuffer 6×	MBI-Fermentas, St-Leon-Rot
DNA-Massenstandard:	
GeneRuler <sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder	MBI-Fermentas, St-Leon-Rot
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder	
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder Plus	
dNTPs	MBI-Fermentas, St-Leon-Rot
Injektionslösung für Sequenzierung	Millipore, Eschborn
Protein-Massenstandard:	
Precision Plus Protein Standard unstained	BioRad, München
Precision Plus Protein Standard prestained	

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden DNA-Fragmenten vervielfältigt (Mullis et al., 1986). Die Zusammensetzungen und die Temperaturprofile der PCRs sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

#### 2.2.1.1. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen

Für Klonierungen wurde der zu klonierende Genabschnitt mittels PCR und flankierender Oligonukleotide aus der Original-DNA amplifiziert. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und das Temperaturprofil sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 2.12: Zusammensetzung und Temperaturprofil der PCR**

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	t [s]
Phusion Reaktion Puffer HF 5×	10,0	95	120
40 mM dNTPs (10 mM je)	1,0	95	60
Primer forward 10 pmol/ $\mu\text{L}$	2,5	55-62	20
Primer reverse 10 pmol/ $\mu\text{L}$	2,5	72	30
Phusion Polymerase	1,0	72	600
Template DNA 10-100 ng	x	4	300
dH <sub>2</sub> O	33,0-x	16	$\infty$

} 29×

#### 2.2.1.2. Error-prone-PCR

Für die Affinitätsreifung der scFv-Fragmente wurden mittels *error-prone*-PCR ungerichtet Basenaustausche in die entsprechenden Genabschnitte eingefügt. Die Mutazyme II DNA-Polymerase des GeneMorph<sup>®</sup> II Random Mutagenesis Kit hat eine Austauschrate von bis zu 16 Basenpaaare je 1 kb. Die Verteilung der Mutationen ist nahezu ausgeglichen. Ein Austausch von A, T zu N findet in 50,7 % und von G, C zu N in 43,7 % der Fälle statt.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung und Temperaturprofil der *error-prone*-PCR

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	t [s]
Reaktion Puffer 10×	2,5	95	120
40 mM dNTPs (10 mM je)	0,5	95	60
Primer forward 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,5	55 bzw. 65	60
Primer reverse 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,5	72	70
Mutazyme II DNA-Polymerase	0,5	72	600
Template DNA 1 ng	1,0	4	300
dH <sub>2</sub> O	19,5	16	$\infty$

### 2.2.1.3. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Variante der Standard-PCR, bei der anstatt aufgereinigter DNA eine Bakterienkolonie für die DNA-Amplifikation verwendet wird. Die Kolonie-PCR diente zum schnellen und einfachen Screening von Einzelkolonien nach Klonierungen.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung und Temperaturprofil der Kolonie-PCR

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	t [s]
REDTaq <sup>TM</sup> Reaktion Puffer 10×	1,0	95	120
40 mM dNTPs (10 mM je)	0,2	95	60
Primer forward 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,2	55 bzw. 65	30
Primer reverse 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,2	72	60
REDTaq <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	0,4	72	600
Template DNA Einzelkolonie	1,0	4	300
dH <sub>2</sub> O	7,0	16	$\infty$

## 2.2.2 Aufreinigung von DNA mit Kit-Systemen

Für die Aufreinigungen von DNA-Fragmenten wurden das Illustra<sup>TM</sup>GFX<sup>TM</sup> PCR and Gel Band Purification Kit und NucleoSpin Extract II Kit verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangabe. Die DNA wurde mit 25 – 50  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O eluiert und die Konzentration photometrisch am Nanodrop ND1000 vermessen.

## 2.2.3 Aufreinigung von DNA mittels Ethanol-Fällung

Zur Aufreinigung oder Ankonzentrierung von DNA aus Lösungen wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt. Das Ausgangsvolumen wurde, falls notwendig, mit dH<sub>2</sub>O auf 100  $\mu\text{L}$  aufgefüllt und mit 10  $\mu\text{L}$  3 M Natriumacetat und 250  $\mu\text{L}$  Ethanol (100 %) versetzt. Nach einer Inkubation von 2 Min bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation von 20 Min mit 16.000  $\times g$  bei 4  $^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in zwei Schritten mit je



500 µL Ethanol (70 %) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet. Die DNA wurde anschließend in 10 – 50 µL dH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.4 Isolierung von DNA mit alkalischer Lyse**

Für einfache Klonierungen und für das Anlegen von Plasmidsicherungen der isolierten scFv-Fragmente wurde die DNA mittels alkalischer Lyse aus *E. coli* isoliert. 3 mL einer üN-Kultur wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µL S1-Lösung resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µL S2-Lösung und 6-maligem Invertieren erfolgte eine Inkubation von 5 min bei RT. Im Anschluss daran wurden 300 µL S3-Lösung hinzu gegeben, erneut invertiert und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde für 15 min bei 16.000 ×g zentrifugiert und 800 µL des Überstand wurden in einem neuen 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 560 µL Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C erfolgte eine Zentrifugation bei 16.000 ×g bei 4 °C für 30 min. Des Pellet wurde 2 mal mit je 500 µL 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µL dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### **2.2.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Kontrolle der DNA aus PCR-Ansätzen bzw. aus Aufreinigungen. Dazu wurden 0,8 – 1,5 %ige Agarosegele verwendet, die mit den DNA-Proben beladen und anschließend im elektrischen Feld (100-140 V, 300 mA) aufgetrennt wurden. Da die Agarosegele mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid versetzt waren, konnte im Anschluss an die Elektrophorese die DNA mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung der DNA wurde ein DNA-Größenstandard mit aufgetragen.

#### **2.2.6 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Konzentrationsbestimmung der DNA wurde photometrisch am Nanodrop ND1000 unter Verwendung der entsprechenden Herstellersoftware bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Eine Absorption von 1 entsprach dabei einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA.

### 2.2.7 Enzymatische Restriktion von DNA

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden diese mit Typ II Restriktionsendonukleasen geschnitten. Diese Restriktionsenzyme schneiden Sequenz-spezifisch und erlauben das gerichtete Klonieren in die entsprechenden Vektoren. Die Restriktionen wurden üblicherweise in 30 µL bei dem jeweiligen Temperaturoptimum, meist 37 °C, der Enzyme durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 3 – 16 h. Im Anschluss daran wurden die Restriktionsendonukleasen für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Nach der Inaktivierung erfolgte ein Aufreinigungsschritt mittels Kit oder Ethanol-Präzipitation.

**Tabelle 2.15: Zusammensetzung einer Restriktion**

Komponente	Volumen [µL]
DNA	x
Restriktionsenzym (z.B. <i>Nco</i> I) 10 U/µL	1,0
Restriktionsenzym (z.B. <i>Not</i> I) 10 U/µL	1,0
Reaktionspuffer 3 (10×)	3,0
BSA (10 ×)	3,0
dH <sub>2</sub> O	22-x

### 2.2.8 DNA-Dephosphorylierung

Die DNA-Dephosphorylierung wurde verwendet um die Religationsraten der geschnittenen Vektoren zu verringern. Für die Dephosphorylierung wurde *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) verwendet. Von dem Enzym wurde 1 h vor Beendigung der Restriktion 1 µL zu dem Restriktionsansatz hinzugegeben und bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA-Ligase bei 16 °C über Nacht oder für 3 h bei Raumtemperatur. Die Zusammensetzung der Ligation wurde so gewählt, dass ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von ca. 1:3 vorlag. Bei der Erzeugung der Affinitätsbibliotheken wurde ein Verhältnis von 1:10 verwendet. Für die Berechnung der eingesetzten Insertmenge wurde folgende Formel verwendet.

$$\frac{\text{Menge Vektor [ng]} * \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} * \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Menge Insert [ng]}$$

Tabelle 2.16: Zusammensetzung einer Ligation

Komponente	Standardklonierung		Affinitätsbibliothekenerzeugung	
	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Menge	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Menge
Reaktionspuffer 10×	1,0	1×	6,0	1×
T4-DNA-Ligase	1,0	3 U	1,0	3 U
Vektor-DNA	1-2	$\approx 100$ ng	10-20	$\approx 1000$ ng
Insert-DNA	4-7	$\approx 200$ ng	30-35	$\approx 750$ ng
dH <sub>2</sub> O	ad 10		ad 60	

### 2.2.10 DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Die Sequenzierungen wurden mittels des BigDye<sup>®</sup> Terminator Sequencing Kit und einer entsprechende Sequenzier-PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mittels Ethanol-Präzipitation gefällt, in 16  $\mu\text{L}$  Injektionspuffer resuspendiert, bei 95 °C für 2 min denaturiert und im ABI Genetic Analyzer 310 analysiert. Die Chromatogramme wurden mit FinchTV ausgelesen und je nach Fragestellungen mit der Internetdatenbank VBASE2 oder dem Sequenzvergleichsprogramm MultiAlin Interface ausgewertet.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung einer Sequenzier-PCR

Komponente	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Temperatur [°C]	t [s]
BigDye <sup>®</sup> Terminatorpuffer 5×	2,0	94	60
Primer 10 pmol/ $\mu\text{L}$	0,5	94	30
BigDye Reaktionsmix	1,0	50	15
Template DNA ( $\approx 30$ ng)	1,0	72	240
dH <sub>2</sub> O	4,5	4	300
		16	$\infty$

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Sambrock et al., 1989)

100 mL 2× YT-Medium wurden mit 1 mL einer üN-Kultur angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer  $\text{OD}_{600} \approx 0,6$  inkubiert. Die Kultur wurde in Polypropylenröhrchen gefüllt und für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 mL TFB1 resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 4 mL TFB2 resuspendiert. Zur Lagerung der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden Aliquots zu je 120  $\mu\text{L}$  in sterilen Mikroschraubgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.2 Transformation mittels Hitzeschock

Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden auf Eis langsam aufgetaut und mit dem gesamten Ligationsansatz vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min und ein Abkühlen auf Eis für 2 min. Nach dem Abkühlen wurden 500 µL auf 37 °C vorgewärmtes SOC Medium zum Ansatz hinzu gegeben und bei 37 °C und 250 rpm für 1 h inkubiert. Der Transformationsansatz wurde kurz bei 400 ×g zentrifugiert, der Überstand abgenommen das Pellet vorsichtig in 100 µL SOC-Medium resuspendiert und auf 2× YT-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte üN bei 37 °C.

### 2.3.3 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Elektroporation wurden bei -80 °C gelagerte elektrokompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) auf Eis aufgetaut und 25 µL der Zellen mit dem zuvor durch Ethanol-Präzipitation entsalzten Ligationsansatz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte in vorgekühlten Küvetten (Elektrodenabstand 1,0 mm) mit einem Puls von 1,8 kV. Nach dem Puls wurde sofort auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium hinzu gegeben und die Zellsuspension für 1 h bei 37 °C bei 300 rpm inkubiert und anschließend auf 2× YT Platten mit entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte üN bei 37 °C.

### 2.3.4 Herstellung von Bakterienzelllysats

Für die Herstellung von Zelllysats wurde eine 5 mL üN-Kultur des entsprechende Bakterienstammes (*E. coli*, *Salmonella*-WT oder *Salmonella*  $\Delta ompD$ ) in 2× YT-G-Medium aus einem Glycerolstock angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. 1 mL der üN-Kultur wurde genutzt um 50 mL 2× YT-G-Medium anzuimpfen. Die Zellen wurden bei 37 °C und 250 rpm bis zu eine  $OD_{600} \approx 1,0$  kultiviert. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 3220 ×g. Das Pellet wurde zweimal in Carbonatpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wurde in 50 mL Carbonatpuffer resuspendiert. der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Sonotrode MS73 mit 60 % Leistung für 3 min). Die Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation bei 3220 ×g für 30 min abgetrennt.

### 2.3.5 Anlegen von Glycerinstocks

Für die dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurden 800  $\mu\text{L}$  einer  $\text{üN}$ -Kultur mit 400  $\mu\text{L}$  80 %igen Glycerin in einem Mikroschraubgefäß vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.6 Selektion von Antikörperphagenbibliotheken

#### 2.3.6.1. Panning auf ganzen Zellen

Für das Panning auf ganzen Zellen wurden 2 unterschiedliche Strategien gewählt. Bei der ersten Strategie wurden *Salmonella* Typhimurium 421/425 Zellen (*Salmonella*-WT) und *Salmonella* Typhimurium  $\Delta ompD$  (*Salmonella*  $\Delta ompD$ ) in 50 mL  $2\times$  YT-G Medium bis zu einer  $\text{OD}_{600} \approx 0,5$  inkubiert. 1 mL der *Salmonella*-WT-Kultur wurde mit  $1 \cdot 10^{11}$  Phagen der „Finern“ –und der HAL4-Antikörpergenbibliothek für 1 h auf dem Überkopfschüttler (ÜKS) inkubiert, anschließend bei  $16.000 \times g$  für 5 min bei RT zentrifugiert und das Pellet in je 1 mL PBS-T gewaschen. Der Waschschrift wurde  $8\times$  wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 0,5 mL HCl/Glycin resuspendiert (saure Elution) und nach 15 min mit Phosphatpuffer neutralisiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei RT und  $16.000 \times g$  für 5 min wurde der Überstand dazu verwendet, das Pellet von 1 mL der *Salmonella*  $\Delta ompD$ -Kultur zu resuspendieren und erneut 1 h auf dem ÜKS zu inkubieren. Nach der Stunde wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand, der die Phagen enthielt, wurde dazu genutzt, um *E. coli*-XL1 Blue MRF' zu infizieren.

Bei der zweiten Strategie wurden die Antikörperphagenbibliotheken zuerst mit 1 mL der *Salmonella*  $\Delta ompD$ -Kultur inkubiert. Nach 1 h auf dem ÜKS wurden die Zellen 5 min bei  $16.000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand dazu verwendet das Pellet von 1 mL der *Salmonella*-WT-Kultur zu resuspendieren. Nach einer erneuten Inkubation von 1 h wurden die Zellen pelletiert und das Pellet  $8\times$  mit je 1 mL PBS-T gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 mL Trypsin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) resuspendiert und für 30 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das Gemisch wurde bei RT und  $16.000 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Der Überstand, der die eluierten Phagenpartikel enthielt, wurde für die Infektion von *E. coli*-XL1 Blue MRF' und die Amplifikation der Phagenpartikel (vgl. 2.3.7) verwendet. Es wurden insgesamt vier Panningrunden durchgeführt.

### 2.3.6.2. Panning auf rekombinantem Protein

Für das Panning auf rekombinantem Protein wurde 1 µg des entsprechenden Proteins in Carbonatpuffer verdünnt und üN bei 4 °C an die Oberfläche einer Vertiefung einer MTP (Nunc Maxisorp®) gekoppelt. Nach einem Waschschrift (3× PBS-T) erfolgte ein Abblocken der nicht besetzten Bindungsstellen durch Befüllen der Kavität mit 2 % MPBS-T. Ein weiterer Waschschrift (3× PBS-T) schloss die Vorbereitungen ab. Nach dem Blocken wurden  $5 \times 10^{11}$  Phagen der Antikörpergenbibliotheken HAL4 und HAL7 in die mit Antigen gekoppelte Vertiefung der MTP gegeben. Zur Konkurrenz von unspezifisch bindenden Antikörperphagen wurde die Bibliothek mit einem Gemisch aus BSA, GST, Milchpulver und *E. coli*-Zelllysat präinkubiert. Die Inkubation der Bibliothek auf dem Antigen erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran erfolgte ein Waschschrift (10× mit PBS-T) zum Entfernen der nicht bzw. unspezifisch gebundenen Phagen. Die gebundenen Phagen wurden mittels einer Inkubation mit 200 µL Trypsin (10 µg/mL) für 30 min bei 37 °C eluiert und für die Infektion von *E. coli*-XL1 Blue MRF' und Amplifikation der Phagenpartikel (vgl. 2.3.7) genutzt. Insgesamt wurden je Panning 3 bis 4 Runden durchgeführt, wobei für die folgenden Runden jeweils die eluierten und reamplifizierten Phagenantikörper der vorangegangenen Runde eingesetzt wurden.

### 2.3.6.3. Affinitätspanning nach *affinity maturation*

Das Affinitätspanning wurde analog zum Panning auf rekombinantem Protein durchgeführt. Für das Panning wurde ein Nunc Maxisorp®-Stripe mit 20, 40, 60, 80 und 100 ng OmpD je Kavität über Nacht bei 4 °C in Carbonatpuffer gekoppelt, im ELISA-Washer dreimal mit PBS-T gewaschen, mit 2% MPBST geblockt und anschließend je Vertiefung 10 µL ( $3,96 \cdot 10^{12}$  Phagen) der mittels *error-prone*-PCR erzeugten Phagenbibliothek in 100 µL 2 % MPBS-T für 3 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit PBS-T (10×). Die eigentliche *offrate*-Selektion erfolgte über 3 Wochen in PBS bei 4 °C. Dazu wurde der Streifen in 1 L PBS unter Rühren inkubiert. Alle 7 Tage wurde das PBS ausgetauscht und gegen frisches ersetzt. Nach den 3 Wochen wurden die gebundenen Phagen mit 200 µL Trypsin (10 µg/mL) eluiert und für die Infektion von *E. coli* XL1-blue MRF' eingesetzt.

### 2.3.7 Infektion von *E. coli* und Produktion von Antikörperphagen

Die eluierten Phagen aus dem Panning wurden zur Infektion von *E. coli*-XL1 Blue MRF' und zur anschließenden Reamplifikation der Phagenpartikel verwendet. Für die Infektion der Zellen wurden diese in 50 mL 2× YT-T-Medium bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert. 20 mL dieser Kultur wurden mit 190 µL der eluierten Phagen versetzt und 30 min stehend und 30 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 3220 ×g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µL 2× YT-GA-Medium aufgenommen. Die Suspension wurde auf 2× YT-GA-Platten (15 cm) ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden mit 5 mL 2× YT-GA-Medium „abgeschwemmt“ und 200 µL dieser Zellen wurden zum Animpfen von 50 mL 2× YT-GA-Medium verwendet. Nach einer Kultivierung bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,5$  wurden 5 mL der Bakteriensuspension ( $\approx 2,5 \times 10^9$  Bakterien) in einem Verhältnis von 1:20 mit dem Helferphagen M13K07 ( $5 \cdot 10^{10}$  cfu) infiziert, 30 min bei 37 °C ohne Schütteln und 30 min mit 250 rpm inkubiert. An die Inkubation schloss sich eine Zentrifugation von 10 min mit 3220 ×g an. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 mL 2× YT-AK-Medium resuspendiert. Die eigentliche Phagenproduktion wurde üN bei 30 °C und 250 rpm durchgeführt. Um die Phagenpartikel zu erhalten wurde die üN-Kultur 20 min bei 3220 ×g zentrifugiert und der Überstand mit 1/5 des Ausgangsvolumen PEG/NaCl versetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h auf Eis. Die Abtrennung der gefällten Phagenpartikel erfolgte durch eine Zentrifugation bei 3220 ×g für 45 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL PDB gelöst, erneut für 5 min bei 16.000 ×g zentrifugiert und der Überstand in ein 2 mL Mikroschraubgefäß überführt.

### 2.3.8 Titerbestimmung von M13K07-Phagen

Für die Titerbestimmung der infektiösen Phagenpartikel nach einer Phagenproduktion bzw. nach einem Panning wurden *E. coli*-XL1 Blue MRF' bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,5$  bei 37 °C kultiviert. Es wurden für eine Verdünnungsreihe je 90 µL der Zellen in einen 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. 10 µL der Originalphagenlösungen wurden für die Verdünnungsreihe verwendet. Dabei erfolgte einer Verdünnung von jeweils 1:10 je Verdünnungsstufe. Alle Zellen wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert, auf 2× YT-GA-Platten ausplattiert und üN bei

37 °C kultiviert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und über die Verdünnungsstufe der Phagentiter bestimmt.

### 2.3.9 Produktion von scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten

Für die erste Charakterisierung der isolierten scFvs wurden diese im MTP-Maßstab produziert. Dazu wurden die Vertiefungen von MTPs (Polypropylen) mit jeweils 150 µL 2× YT-GA-Medium befüllt und mit Einzelkolonien direkt von den Selektionsplatten aus dem Panning beimpft. Die Kavitäten H3 und H6 dienten als Negativkontrollen und wurden nicht beimpft. H9 und H12 dienten als Positivkontrollen und wurden mit dem D1.3-scFv  $\alpha$ -Lysozym produzierenden Klon TB32-2 angeimpft. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer luftdurchlässigen Membran verschlossen und üN bei 37°C und 1200 rpm inkubiert. Von der so erhaltenen Masterplatte wurden 10 µL je Kavität in eine neue MTP mit 150 µL 2× YT-GA-Medium pro Kavität überführt und für 2 h bei 37 °C und 1200 rpm kultiviert. Um die scFv-Produktion zu induzieren, wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Dazu wurde die PP-MTP für 10 min bei 3220 ×g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit je 170 µL 2× YT-A-Medium mit 50 µM IPTG resuspendiert. Die Produktion der löslichen scFvs erfolgte über Nacht bei 30 °C und 1200 rpm. Nach der Produktion folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 3220 ×g. Der Überstand wurde in eine neue PP-MTP überführt und konnte direkt für einen ELISA eingesetzt werden. In die Kavitäten der Masterplatte wurden jeweils 20 % (v/v) Glycerin hinzugegeben und die Platten zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

### 2.3.10 Produktion von scFv-Fragmenten in Schüttelkolben

Für die Produktion im größeren Maßstab wurden die scFv-Fragmente in den für Produktionen optimierten Vektor pOPE101-XP umklont. Die Produktion erfolgte im 500 mL-Maßstab in 2 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikane. Die Produktionskultur in 2× YT-GA-Medium wurde mit 15 mL einer üN-Kultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} \approx 0,8$  bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die Induktion erfolgte mit 50 µM IPTG. Die Produktion erfolgte für 3 h bei 25 °C oder für 16 h bei 30°C mit anschließender Isolation der periplasmatischen Fraktion (PPP). Bei der Produktion über 16 h wurde zusätzlich zur PPP auch noch eine Ammoniumsulfatfällung des Kulturüberstandes durchgeführt, da ein Großteil der produzierten scFv-Fragmente in das Medium sekretiert wurde.



### 2.3.11 Produktion von GST-OmpD mit His-tag in *inclusion bodies*

Für die Expression von GST-OmpD-His wurde eine 200 mL üN-Vorkultur von TM71.2 in LB-GA Medium bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die üN-Kultur wurde bei 7000 ×g für 10 min zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden 2× mit 50 mL LB-Medium gewaschen und anschließend in 200 mL LB-A Medium mit 1 mM IPTG resuspendiert. Die Expression erfolgte für 2 h bei 37°C und 250 rpm. Nach der Expression wurden die Zellen für 10 min bei 7000 ×g sedimentiert und das Pellet in 5 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) mit 25 % Saccharose resuspendiert. Die Suspension wurde bei -80°C für 20 min eingefroren. Anschließend wurde das Pellet bei RT aufgetaut und Lysozym (1 mg/mL) zugegeben. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden 10 mL einer 5:4 Mischung von 2× RIPA und TET hinzugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall mit der MS73 für 3 min bei 65% Leistung auf Eis. Die Suspension wurde erneut für 20 min bei 7000 ×g zentrifugiert und das Pellet in 3 mL 8 M Harnstoff/PBS gelöst. Das gelöste Protein wurde für eine IMAC unter denaturierenden Bedingungen eingesetzt.

### 2.3.12 Produktion von *Campylobacter*-spezifischen Antigenen

Die Expression der *Campylobacter* Antigene *major outer membrane protein C. coli* (MompC) und *major outer membrane protein C. jejuni* (MompJ) wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Jeweils eine üN-Kultur der entsprechenden Klonen in 50 mL LB-GA-Medium wurde bei 37°C und 250 rpm kultiviert. Mit 5 mL dieser üN-Kultur wurden 500 mL LB-A-Medium angeimpft und bei 37 °C weiter kultiviert. Induziert wurde mit 1 mM IPTG bei einer  $OD_{600} \approx 0,75$ . Nach 3 h Expression bei 37 °C wurde das Zellpellet für 20 min bei 8000 rpm, (GS3-Rotor) sedimentiert und anschließend über Nacht bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde aufgetaut und in 10 mL Lysis-Puffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 10 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, pH 8,0) aufgenommen und 15 min bei RT inkubiert. Zum besseren Zellaufschluss wurde zusätzlich noch 2× 20 sec mit der Sonotrode MS73 bei 65 % Leistung ein Ultraschallimpuls gegeben. Nach dem Ultraschall wurde 2× für 20 min bei 3220 ×g zentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde zusätzlich durch einen 0,45 µm Filter filtriert und für eine IMAC unter denaturierenden Bedingungen verwendet.

### 2.4 Biochemische Methoden

#### 2.4.1 Isolation der Periplasmatischen Fraktion von *E. coli*

Am Ende der Produktion von löslichen scFv-Fragmenten (vgl. 2.3.10) wurden die Zellen durch eine Zentrifugation von 5 min bei  $10.000 \times g$  vom Kulturmedium abgetrennt. Der Kulturüberstand wurde nach einer dreistündigen Produktion verworfen oder nach einer sechzehn-stündigen Produktion für eine Ammoniumsulfatfällung (vgl. 2.4.2) verwendet. Das Zellpellet wurde im 1/10 des Kulturvolumens eiskaltem Schockpuffer resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 20 min auf Eis. Während der Inkubation wurde die Suspension alle 2 min durchmischt. Zur Gewinnung der periplasmatischen Fraktion (PPP) wurden die Zellen bei  $30.000 \times g$  für 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand über Nacht gegen 5 L PBS dialysiert.

#### 2.4.2 Ammoniumsulfatfällung von Produktionsüberständen

Aus dem Kulturüberstand wurden nach einer Produktion über 16 h im Schüttelkolben die scFv-Fragmente mittels Ammoniumsulfat gefällt. In je 100 mL Kulturüberstand wurden unter stetigem Rühren bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  44 g Ammoniumsulfat gelöst. Das Ammoniumsulfat wurde in drei Portionen zum Überstand hinzu gegeben, wobei die nächste Portion zugefügt wurde, wenn sich das Salz aus der Vorigen vollständig gelöst hatte. Nach dem vollständigen Lösen der dritten Portion wurde der Überstand für weitere 30 min gerührt. Der Kulturüberstand wurde anschließend für 30 min bei  $7700 \times g$  zentrifugiert, das Pellet in 10 mL PBS gelöst und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gegen 5 L PBS dialysiert.

#### 2.4.3 Aufreinigung von scFv-Fragmenten mittels IMAC

Die dialysierten Fraktionen der PPP und der Ammoniumsulfatfällung wurden vereinigt und mit 5 molaren Stammlösungen von NaCl und Imidazol auf eine Endkonzentration von 10 mM Imidazol und 0,5 M NaCl eingestellt. Zusätzlich wurden die Fraktionen im Verhältnis 1:1 mit IMAC-Bindepuffer verdünnt. Die so erhaltene Lösung wurde für 1 h mit 500-700  $\mu\text{L}$  Chelating Separose FF auf einem Überkopfschüttler bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach einer Zentrifugation ( $500 \times g$ , 3 min) wurde der Überstand als Durchfluss-Fraktion abgenommen und die Matrix mit 4 mL IMAC-Bindepuffer für 5 min auf dem ÜKS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugati-

on wurde der Überstand als Waschfraktion 1 abgenommen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 4 mL IMAC-Waschpuffer 1 und IMAC-Waschpuffer 2 erfolgte die Elution der scFv-Fragmente von der Matrix durch Inkubation mit zweimal 2 mL IMAC-Elutionspuffer. Die Lagerung der eluierten Fraktionen erfolgte bei 4 °C. Für eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde allen Lösungen zusätzlich 8 M Harnstoff hinzugesetzt.

#### 2.4.4 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Für die diskontinuierliche Proteingelelektrophorese wurden SDS-Polyacrylamidgele mit Sammel- und Trenngel verwendet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde es mit dem Sammelgel überschichtet, in das ein Kamm für die Ausbildung der Probentaschen eingeführt wurde. Nach ca. 20 min war das Sammelgel polymerisiert und der Kamm konnte entfernt werden. Das Gel wurde in eine mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllte Laufkammer gestellt und anschließend die zuvor mit Laemmli-Puffer versetzten und bei 95 °C denaturierten Proben auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein molarer Massenstandard (Proteinmarker) aufgetragen. Die Proben wurden für ca. 45 min bei 25 mA und 300 V elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel entweder für eine Coomassiefärbung oder Western-Blot eingesetzt.

**Tabelle 2.18: Zusammensetzung der SDS-PAA-Proteingele**

Komponente	Volumen [μL]	
	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4%)
Acrylamid-Mix	1600	260
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1000	---
dH <sub>2</sub> O	1300	1000
1 M Tris-HCl pH 6,8	---	200
10 % SDS	40	15
APS	40	15
TEMED	2	2

#### 2.4.5 Coomassiefärbung von Proteingelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben im Gel wurden diese mit Coomassie Blue<sup>®</sup> gefärbt. Das Gel wurde in 15 mL Färbelösung gelegt und kurz in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Nach einer Inkubation von 20 min unter ständiger Bewegung wurde die Färbelösung verworfen, das Gel mit dH<sub>2</sub>O gespült und in Entfärbelösung gegeben.

Nach erneutem Aufkochen in der Mikrowelle wurde das Gel für mindestens weitere 30 min auf der Wippe entfärbt und anschließend in Wasser gelagert.

### 2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach einer Produktion und Aufreinigung erfolgte mittels eines Coomassie SDS-PAGE. Für die Proteinbestimmung wurden die zu testenden Proben und ein Standard bekannter Konzentration (TM44-C7) in verschiedenen Verdünnungen mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt (vgl. 2.4.4 und 2.4.5). Anschließend wurden die Gele gescannt und mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Die Zielproteinbanden wurden markiert und die Farbintensität mittels Histogrammplot bestimmt. Die Peakflächen wurden mit den bekannten Proteinkonzentrationen des Standards korreliert und eine Kalibriergerade erstellt. Anhand der Geradengleichung konnte die Proteinkonzentration der unbekannten Proben berechnet werden.

### 2.4.7 Western-Blot

Mittels Western-Blot wurden Proteine nach der Auftrennung mit einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen. Für die Übertragung wurde ein Filterpapier (ca. 3 mm, BioRad) mit Transferpuffer getränkt und auf die Blot-Apparatur gelegt. Darauf wurde eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran gefolgt vom SDS-PAA-Gel und wiederum einem getränkten Filterpapier gelegt. Mögliche Luftblasen zwischen den Schichten wurden entfernt, die Transferkammer geschlossen und die Übertragung der Proteine im elektrischen Feld (20 V, 750 mA, 35 min) durchgeführt.

### 2.4.8 Immunfärbung

Nach einem Western-Blot wurde die PVDF-Membran mit den übertragenen Proteinen für eine Immunfärbung verwendet. Um unspezifische Bindungen während der Immunfärbung zu verhindern, wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur oder üN bei 4 °C in 2 % MPBS-T inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran 2× mit PBS-T gewaschen und anschließend mit einem protein- oder tagspezifischen Antikörper (z.B. Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10, 1:500) in 2 % MPBS-T für 1 h inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS-T wurde der Zweitantikörper z.B. Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG Fc-spezifisch AP-Konjugat,

1:10.000 in MPBS-T zu der Membran gegeben und wieder für 1 h inkubiert. Die Färbung erfolgte nach zwei Waschschritten mit PBS-T und zwei weiteren Waschschritten in Substratpuffer mit Substratlösung (NBT/BCIP je 1:100 in Substratpuffer. Der Farbniederschlag war nach 1 bis 30 min zu sehen und die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit Wasser gestoppt. Die gefärbte Membran wurde zwischen Filterpapier getrocknet und anschließend gescannt.

#### **2.4.9 Indirekter Antigen-ELISA**

Die jeweiligen Antigene wurden in gewünschter Konzentration in Carbonatpuffer  $\text{üN}$  bei 4 °C oder 1 h bei RT an die Mikrotiterplatte gebunden. Die Antigenlösungen wurden durch 3 maliges Waschen mit PBS-T im ELISA-Washer entfernt. Die Kavitäten wurden durch Inkubation mit jeweils 320  $\mu\text{L}$  2 % MPBS-T für 1 h bei Raumtemperatur abgeblockt. Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurden die potentiell antigenspezifischen Antikörperfragmente (gelöst in 2 % MPBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurde der erste Nachweisantikörper (z. B. Maus- $\alpha$ -c-myc IgG 9E10 1:500 in 2 % MPBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (100  $\mu\text{L}$  pro Kavität). Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurde der zweite Nachweisantikörper (z. B. Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG Fab spez. HRP-Konjugat 1:10000 in 2 % MPBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (100  $\mu\text{L}$  je Vertiefung). Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurden je 100  $\mu\text{L}$  Substratlösung (TMB-A 20 Teile + TMB-B 1 Teil) in die Vertiefung gegeben. Die Farbreaktion erfolgte für 5-20 Minuten und wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gestoppt. Die Säurezugabe bewirkte einen Farbumschlag von Blau nach Gelb. Anschließend wurde die Absorption bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  (Referenzmessung bei  $\lambda = 620 \text{ nm}$ ) für jede Vertiefung im Tecan Sunrise ELISA-Reader ermittelt.

#### **2.4.10 ELISA mit Kompetition**

Der ELISA mit Kompetition wurde wie ein indirekter Antigen-ELISA durchgeführt. Der Unterschied bei diesem ELISA liegt darin, dass nach der Kopplung des Antigens und dem Blocken der freien Bindungsstellen in den Kavitäten eine Inkubation mit dem zu testenden Schweineserum in verschiedenen Verdünnungen erfolgte. Erst nach der Inkubation mit dem Serum und einem Waschschrift am ELISA-Washer wurde der nachzuweisende scFv in die

Kavitäten gefüllt. Das scFv-Fragment wurde in 2 % MPBS-T und Schweineserum in der zu testenden Verdünnung verdünnt. Der Nachweis erfolgte über Maus- $\alpha$ -c-myc IgG 9E10 1:500 und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG Fab spez. HRP-Konjugat 1:10000 in 2 % MPBS-T für je 1 h. Die Farbreaktion erfolgte analog zum indirekten Antigen-ELISA durchgeführt.

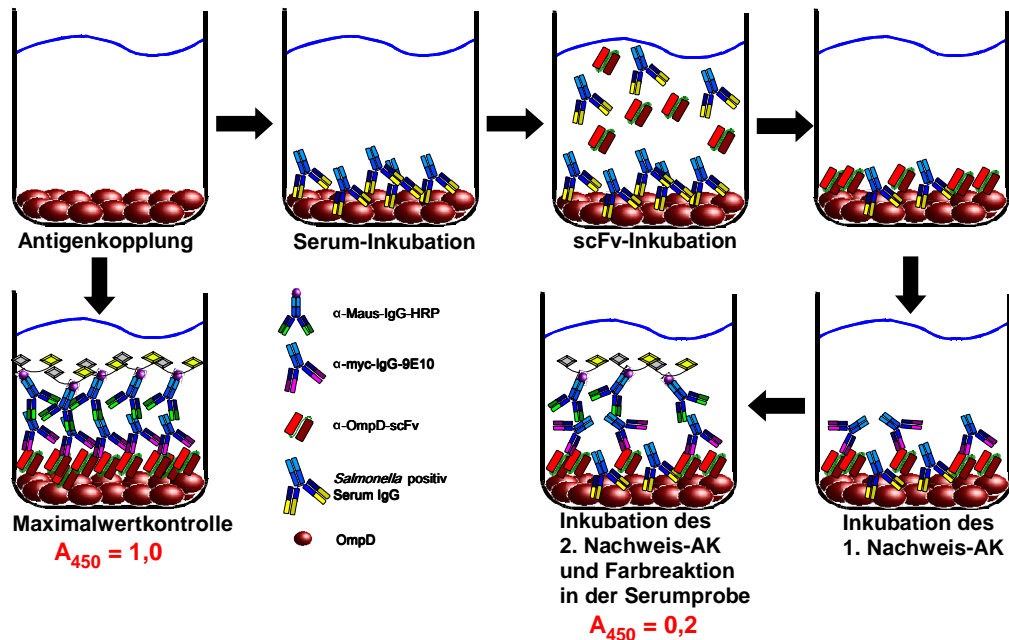


Abbildung 2.1: schematischer Aufbau des kompetitiven ELISA

#### 2.4.11 Epitopbestimmung der isolierten scFv-Fragmente

Die Epitopbestimmung erfolgte ähnlich wie eine Immunfärbung, jedoch wurde hierfür keine gebloottete PVDF-Membran sondern eine Celuloseacetatmembran verwendet. Auf diesen Membranen wurden 15mer Peptidspots mit 3er Überhang synthetisiert (Ronald Frank, HZI). Diese Membranen stellen das gesamte Zielprotein (OmpD, MompC, MompJ) als Peptide dar. Nach dem Blocken der Membranen mit 2 % MPBS-T erfolgte die Inkubation mit den isolierten, im ELISA getesteten und im Schüttelkolben produzierten scFv-Fragmenten (4  $\mu$ g scFv in 20 mL 2% MPBS-T) für 1 h bei RT. Der gebundene scFv wurde über den myc-Tag nachgewiesen. Dies erfolgte über die Nachweisantikörper Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10, 1:500 und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG Fc-spezifisch AP-Konjugat, 1:10.000 in MPBS-T für jeweils 1 h. Nach jeder Inkubation erfolgte ein Waschschriff von 10 min mit PBS-T. Vor der Entwicklung wurden die Membranen mit TBS-T und CBS gewaschen. Als Substrat für die Färbung wurde MTT/BCIP (100  $\mu$ L 1 M  $MgCl_2$ ; 80  $\mu$ L BCIP; 120  $\mu$ L MTT in 20 mL CBS) verwendet. Die Färbung erfolgte für 20 min bis 2 h. Um alle isolierten scFv-Fragmente zu testen, wurden die Memb-

ranen nach der Färbung und dem Scannen regeneriert. Die Regenerierung erfolgte durch eine Reihe von Waschschritten. Jeder Waschschriff erfolgte für 15 min mit 20 mL der entsprechenden Lösung in folgender Reihenfolge: 2× DMF; 2× dH<sub>2</sub>O; 2× Stripping-Puffer A; 2× dH<sub>2</sub>O; 2× Stripping-Puffer B und 2× 100 % Ethanol. Die Lagerung der Membranen erfolgte bei -20 °C.

## **2.5 Biophysikalische Methoden**

### **2.5.1 Größenausschlußchromatographie**

Die Größenausschlußchromatographie (SEC) wurde am ÄKTA-Purifier durchgeführt. Für die Auftrennung wurde eine Superdex75 10/300 GL Säule verwendet. Als Probenvolumen wurde je nach Konzentration des entsprechenden scFv 200 oder 500 µL verwendet. Die Fließgeschwindigkeit während der Chromatographie lag bei 0,5 mL/min. Als Lauf- und Probenpuffer wurde PBS verwendet. Um die Retentionszeiten mit der Proteinmasse korrelieren zu können, wurde vor der ersten Chromatographie eine Eichgerade mit Proteinen definierter Größe (Chymotrypsin, Ovalalbumin, Albumin) erstellt.

### **2.5.2 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)**

Die SPR-Messung mittels Biacore® gibt die Möglichkeit Interaktionen von Antikörper und Antigen in Echtzeit messen zu können. Vor der Kopplung wurde ein pH-*scouting* durchgeführt. Der isoelektrische Punkt des Peptides liegt bei 8,14. Für das pH-*scouting* wurde 10 mM Acetatpuffer pH 4,5 verwendet. In diesem Puffer wurde das Peptid in verschiedenen Konzentrationen [1mg/mL; 100 µg/mL; 10 µg/mL] gelöst. Das pH-*scouting* funktionierte am besten mit der Peptidkonzentration 100 µg/mL und wurde auch für die Kopplung eingesetzt. Die kovalente Bindung des OmpD1-Peptides an den CM5-Chip erfolgte durch eine Thiolkopplung, bei der der C-terminale Cysteinrest des Peptids für die Kopplungsreaktion genutzt wird. Die Chipoberfläche wurde zunächst nach Herstellerangabe (BIAapplications Handbuch) mit NHS/EDC und PDEA in Boratpuffer aktiviert. Das OmpD1-Peptid (100 µg/mL) wurde in 10 mM Acetatpuffer gelöst und mit 38 bzw. 2000 RU an den Chip gekoppelt. Als Negativkontrolle diente das SHERK2-Peptid (100 µg/mL), das in der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand. Nach erfolgter Kopplung wurde die restliche Chipoberfläche mit L-Cystein (50 mM) abgesättigt. Die Messungen erfolgten mit dem scFv-Fragment TM44-C7 in einer Konzentra-

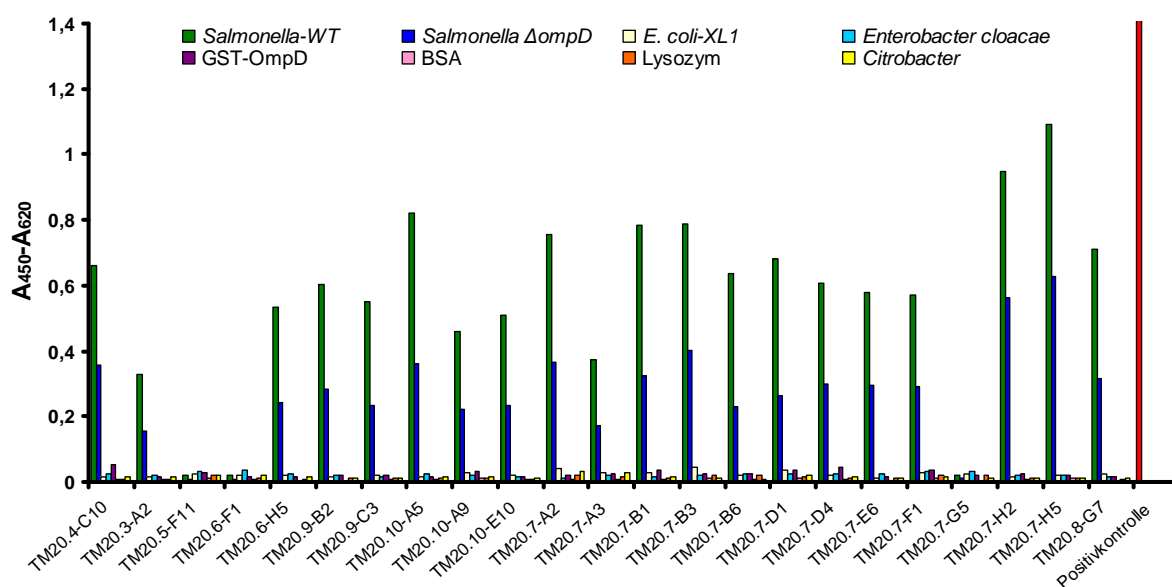
tion von 100  $\mu\text{g/mL}$  und einer Flussrate von 50  $\mu\text{L/min}$ . Die Assoziationszeit, in der das scFv-Fragment über die Chipoberfläche geleitet wird und die Möglichkeit zur Bindung an das Peptid hat, wurde auf 300 s gesetzt. Die Dissoziationszeit, in der nur noch der Laufpuffer (0,005 % PBS-T) ohne scFv-Fragment injiziert wird, betrug 600 s.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Subtraktives Panning auf *Salmonella* Typhimurium

In dieser Arbeit sollten OmpD-spezifische scFv-Fragmente aus naiven Antikörpergenbibliotheken isoliert werden. Dazu wurden unterschiedliche Selektionsstrategien mit verschiedenen Genbibliotheken verfolgt. Im ersten Ansatz wurden die HAL4- (Hust et al., 2007) und „Finnern“-Antikörpergenbibliothek (Finnern et al., 1997) für ein subtraktives Panning auf ganzen Zellen eingesetzt. Für das Panning wurden die Bibliotheken alternierend auf *Salmonella*-WT und *Salmonella*  $\Delta$ ompD inkubiert, um eine spezifische Anreicherung von OmpD-bindenden scFv-Fragmenten zu erreichen. Im Anschluss an das Panning erfolgte die Untersuchung mittels löslich produzierter scFv-Fragmente. Insgesamt wurden 920 Einzelklone aus der vierten Selektionsrunde bezüglich ihrer Bindung an *Salmonella*-WT analysiert. 23 Klone ergaben in den ersten Analysen ein positives Signal auf Salmonellen. Die scFv-Fragmente, die eine Bindung im ELISA auf *Salmonella*-WT zeigten, wurden erneut in MTPs produziert und auf Kreuzreaktion mit verschiedenen Antigenen und Bakterienstämmen getestet (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: ELISA zur Analyse von Kreuzreaktionen nach subtraktiven Panning**

1  $\mu$ g/Kavität BSA, Lysozym und GST-OmpD bzw. 100  $\mu$ L der Bakterienkulturen ( $OD_{600} \approx 1,0$ ) wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Positivkontrolle ist der  $\alpha$ -Lysozym-D1.3-scFv (TB32-2). Der Nachweis der aus 20  $\mu$ L MTP-Produktionskulturüberstand gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

Die analysierten scFv-Fragmente banden nicht nur an *Salmonella*-WT sondern auch an *Salmonella*  $\Delta$ ompD. Die Bindung an *Salmonella*  $\Delta$ ompD war in allen Fällen schwächer, was evt. an unterschiedlichen Kopplungseigenschaften der Bakterien liegen könnte. Eine Bindung auf anderen Bakterienstämmen wie *E. coli* XL1-Blue MRF', *Citrobacter* oder *Enterobacter cloacae* und auch auf BSA oder Lysozym wurde nicht nachgewiesen. Somit binden sie spezifisch an Salmonellen. Da *Salmonella*-WT und *Salmonella*  $\Delta$ ompD, nicht aber das GST-OmpD-Fusionsprotein erkannt wurde, muss ein anderes Salmonellen-spezifischen Protein erkannt worden sein.

Im Anschluss an den in Abbildung 3.1 dargestellten ELISA wurden alle Antikörperfragmente, die an Salmonellen banden, sequenziert. Anhand der Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass nur zwei sequenzverschiedene scFv-Klone aus der „Finnern“-Antikörpergenbibliothek isoliert wurden. Die Keimbahnlinien der isolierten scFv-Klone sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Aus der HAL4-Antikörpergenbibliothek konnten keine spezifisch an Salmonellen bindenden scFv-Klone isoliert werden.

**Tabelle 3.1: Keimbahnlinien der isolierten scFv-Klone aus der Finnern-Bibliothek**

scFv-Klon	V V <sub>H</sub>	D V <sub>H</sub>	J V <sub>H</sub>	V V <sub>L</sub>	J V <sub>L</sub>
TM20.6-H5	IGHV3-30-3*01	IGHD3-3*01	IGHJ5*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*02
TM20.9-C3	IGHV3-30-3*01	IGHD6-19*01	IGHJ2*01	IGKV1-8*01	nicht angegeben

Die vollständigen Sequenzdaten sind aus patentrechtlichen Gründen nicht dargestellt.

Da der diagnostische ELISA an der IVD GmbH (Hannover) auf dem rekombinanten OmpD durchgeführt werden sollte, konnten die beiden scFv-Antikörperklone TM20.6-H5 und TM20.9-C3 in dieser Arbeit nicht weiter verwendet werden.

### 3.2 Isolation von spezifischen scFv-Fragmenten gegen OmpD

Mit einer neuen Selektionsstrategie wurde versucht, Antikörperfragmente zu isolieren, die auch an das rekombinante OmpD binden. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit rekombinantem OmpD-Protein gearbeitet. Das rekombinant in *E. coli* hergestellte GST-OmpD Fusionsprotein wurde vom Mikrobiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt und für Antikörperselektion und die Analyse eingesetzt. Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, war das zur Verfügung gestellte Fusionsprotein verunreinigt. Deshalb mussten intensive Abreicherungsstrategien dem eigentlichen Panning vorangestellt

werden, um keine Antikörperphagen, die gegen die Verunreinigungen gerichtet sind, anzureichern.



**Abbildung 3.2: GST-OmpD-Fusionsprotein**

Coomassie-gefärbtes SDS PAA-Gel der GST-OmpD-Fusionsproteinfraktion. Aufgetragen wurde der Überstand von isolierten *inclusion-bodies*, die in 5 M Harnstoff gewaschen wurden. Der Pfeil kennzeichnet die GST-OmpD-Bande bei ca. 64 kDa. Die Analyse mittels SDS-PAA-Gel wurde vom Mikrobiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt

Für die nachfolgenden Selektionsstrategien wurde die humane, naive Antikörpergenbibliothek HAL4- und die HAL7-Bibliothek verwendet. Die Antikörpergenbibliothek HAL4 enthält scFv-Fragmente mit  $V_L$  vom Typ  $\kappa$ . Die Antikörpergenbibliothek HAL7 hingegen enthält scFv-Fragmente mit  $V_L$  vom Typ  $\lambda$ .

### 3.2.1 Panning auf rekombinantem GST-OmpD

Da das GST-OmpD Fusionsprotein nicht unter nativen Bedingungen isoliert werden konnte und nur in 8 molaren Harnstoff vorlag, wurde das Protein für die Selektion von Antikörperfragmenten gegen GST-OmpD zuvor gegen PBS mit Harnstoff dialysiert, um eine möglichst geringe Harnstoffkonzentration zu erreichen. 2 M Harnstoff in PBS war die geringste Konzentration, bei der das Fusionsprotein noch gelöst war und nicht aggregierte. Da das GST-OmpD stark verunreinigt war, wurden die Bibliotheken vor dem eigentlichen Panning mit mehreren Proteinen und Bakterienlysat präinkubiert, um unspezifisch bindende Antikörperphagen abzureichern. Für die Präinkubation wurde ein Gemisch aus 1 % MPBS-T, BSA, rekombinantes GST und *E. coli*-Zelllysat des GST-OmpD Produktionsstammes verwendet.

**Tabelle 3.2: Parameter für das Panning auf GST-OmpD**

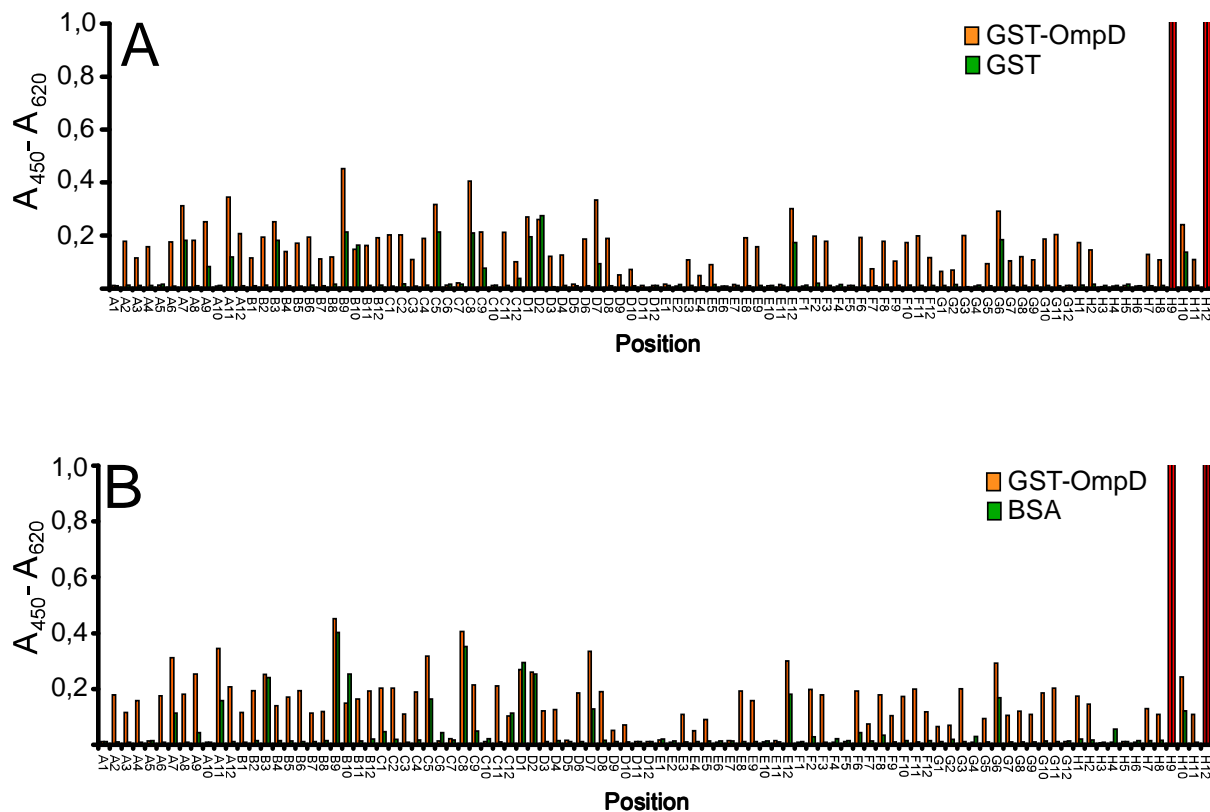
Versuchsnummer	Bibliothek	Verpackung	Präinkubation
SH116-TM41	HAL4	Hyperphage	1 % Milchpulver, 1% BSA, 40 $\mu$ L GST [4 mg/mL], 1 mL <i>E. coli</i> -Zelllysat in 10 mL PBS-T
SH117-TM42	HAL4	M13K07	
SH118-TM43	HAL7	Hyperphage	
SH119-TM44	HAL7	M13K07	

Es wurden jeweils vier sequentielle Selektionsrunden mit den Antikörpergenbibliotheken HAL4 bzw. HAL7 durchgeführt. Nach der ersten Selektionsrunde wurde die Antigenmenge

von 76 µg/Kavität auf 0,76 µg/Kavität reduziert. In den folgenden Runden wurde M13K07 und nicht mehr Hyperphage als Helferphage zur Verpackung der eluierten und amplifizierten Phagenpartikel verwendet, um ein monovalentes Display und damit die Selektion höheraffiner Binder zu unterstützen.

### 3.2.2 Analyse von monoklonal, löslichen scFv-Fragmenten

Aus der dritten und vierten Runde wurden insgesamt 736 Einzelklone für eine erste Charakterisierung für die Produktion von monoklonalen, löslichen scFv-Fragmenten im MTP-Maßstab verwendet. Die Produktionsüberständen wurden mittels ELISA gegenüber GST-OmpD, GST, BSA, *E. coli*-Zelllysate, *Salmonella*-WT und *Salmonella*  $\Delta$ ompD untersucht.

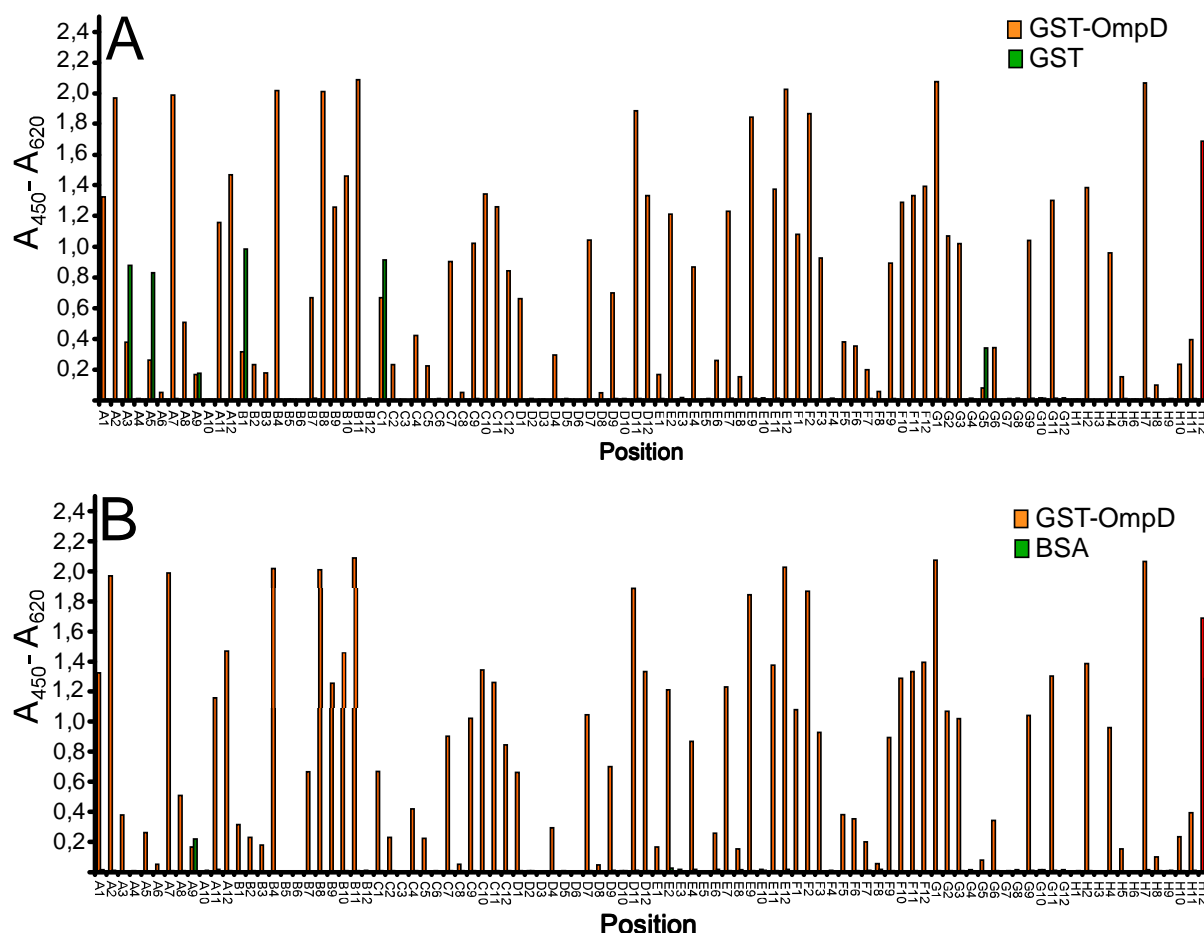


**Abbildung 3.3: ELISA mit scFv-Fragmenten aus der HAL4-Bibliothek**

1 µg/Kavität GST-OmpD, GST und BSA wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Positivkontrolle ist der  $\alpha$ -Lysozym-D1.3-scFv (TB32-2) in H9 und H12. Der Nachweis der aus 20 µL MTP-Produktionskulturüberstand gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB. Aufgrund der geringen Messergebnisse und zur besseren Skalierung wurde die Ordinate und damit die Messwerte der Positivkontrolle bei 1,0 gekappt. Messwerte der Positivkontrolle waren 1,6.

Aus der HAL4-Antikörpergenbibliothek konnten keine OmpD-spezifischen scFv-Klone isoliert werden. In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse der ELISA auf GST-OmpD, GST und

BSA beispielhaft für 94 HAL4-scFv-Klone dargestellt. Einerseits wird deutlich, dass die Messsignale insgesamt sehr gering in Bezug auf die Positivkontrollen ausfielen und für fast alle OmpD bindenden scFv-Klone auch eine Bindung an die Kontrollantigene nachgewiesen wurde. Deshalb wurden keine scFv-Klone aus der Selektion mit der HAL4-Bibliothek weiterverwendet.



**Abbildung 3.4: ELISA mit scFv-Fragmenten aus der HAL7-Bibliothek**

1 µg/Kavität GST-OmpD, GST und BSA wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Positivkontrolle ist der  $\alpha$ -Lysozym-D1.3-scFv (TB32-2) in H9 und H12. Der Nachweis der aus 20 µL MTP-Produktionskulturüberstand gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

Aus dem Panning mit der HAL7-Antikörpergenbibliothek wurde eine Vielzahl von scFv-Klonen isoliert, die spezifisch an OmpD banden. (Abbildung 3.4). Die Signale waren wesentlich höher als bei der Analyse der HAL4-Bibliothek. Eine Kreuzreaktion mit den Kontrollantigenen war nur bei wenigen scFv-Klonen nachzuweisen. Insbesondere eine Kreuzreaktion mit GST wäre zu erwarten gewesen, da es sich bei dem Zielprotein um ein Fusionsprotein aus GST und OmpD handelt. Die Abreicherungsstrategie hat in diesem Panning funktioniert.

### 3.2.3 Sequenzierung der isolierten scFv-Fragmente

Die Sequenzdaten der DNA-Sequenzierung von 31 OmpD-spezifischen scFv-Klonen aus der vierten Runde wurden mit der Software Finch TV und der Datenbank VBASE2 (Retter et al., 2005) ausgewertet. In den 31 analysierten Antikörperklonen waren vier unterschiedliche Gensequenzen enthalten. Die Sequenz des scFv-Klons TM43-G2 wurde insgesamt 16 mal nachgewiesen. Die anderen drei Gensequenzen waren dagegen gleich häufig zu finden. Da in der vierten Runde die Diversität geringer wird, wurden zusätzlich aus der dritten Runde 47 OmpD-spezifische scFv-Klone sequenziert. Neben den scFv-Klonen, die in der vierten Runde identifiziert worden waren, wurden drei neue scFv-Klone identifiziert. Auch in der dritten Runde war die Sequenz des Klons TM43-G2 sehr häufig vertreten. Die individuellen scFv-Klone, die in dieser Arbeit weiterverwendet wurden sind in Tabelle 3.3 angegeben.

**Tabelle 3.3: Keimbahnlinien der isolierte scFv-Klone aus der HAL7-Bibliothek**

scFv-Klon	V V <sub>H</sub>	D V <sub>H</sub>	J V <sub>H</sub>	V V <sub>L</sub>	J V <sub>L</sub>
TM43-C5	nicht angegeben	IGHD2-21*01	IGHJ4*02	IGLV3-19*01	IGLJ2*01
TM43-E10	IGHV1-2*02	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	IGLV1-44*01	IGLJ2*01
TM43-F8	nicht angegeben	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	IGLV2-14*04	IGLJ2*01
TM44-C8	IGHV5-51*01	IGHD6-19*01	IGHJ3*02	IGLV2-8*01	IGLJ2*01
TM43-E2	IGHV1-46*03	IGHD3-9*01	IGHJ4*02	IGLV3-19*01	IGLJ3*02
TM43-G2	IGHV3-7*01	IGHD6-6*01	IGHJ5*02	IGLV3-19*01	IGLJ2*01
TM44-C7	IGHV3-7*01	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	IGLV3-1*01	IGLJ2*01

Die vollständigen Sequenzdaten sind aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

### 3.2.4 Klonierung und Produktion von GST-OmpD-His<sub>6</sub>

Um auszuschließen, dass die isolierten scFv-Fragmente an Verunreinigungen binden, wurde versucht das GST-OmpD über die GST-Domäne mittels einer Affinitätschromatographie aufzureinigen. Dieses war unter denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff nicht möglich. Deshalb wurde ein neues Fusionskonstrukt aus GST-OmpD und einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag konstruiert (Abbildung 3.5). Die Klonierung erfolgte mit dem Ausgangsvektor pSOM500 unter Verwendung des Oligonukleotidpaares TM-pSOM500\_fw und TM-pSOM500\_His-rev und wurde mittels Sequenzierung überprüft.

```

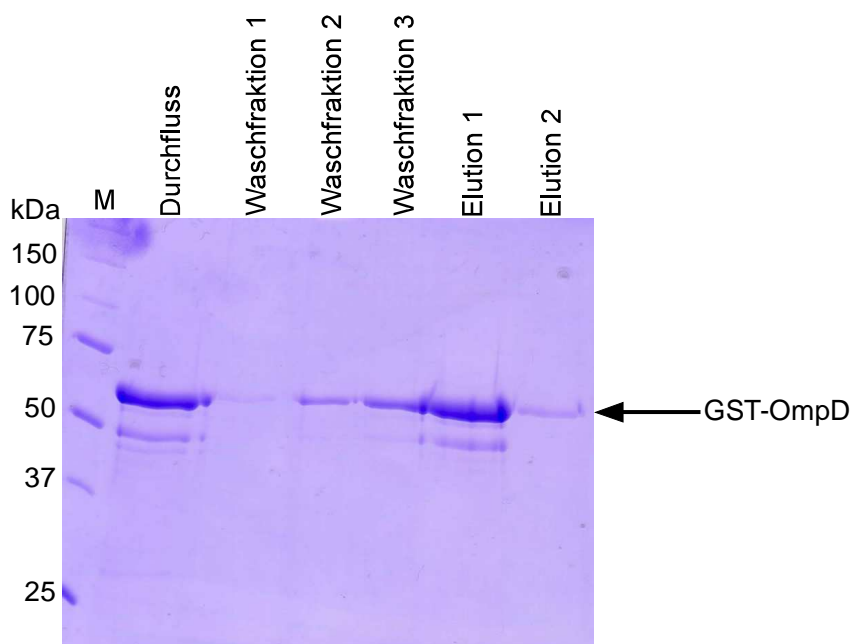
      L   N   Y   Q   F   H   H   H   H   H   H   *   *
CTGTTGGTCT GAACTACCAG TTCCATCACC ATCACCATCA CTAATGA
GACAACCAGA CTTGATGGTC AAGGTAGTGG TAGTGGTAGT GATTACT

```

**Abbildung 3.5: Sequenzausschnitt von pSOM500 GST-OmpD-His<sub>6</sub>**

Die Abbildung zeigt den C-terminalen Ausschnitt des klonierten Vektors pSOM500 GST-OmpD-His<sub>6</sub>. Es ist der His-tag gefolgt von zwei Stoppcodons zu sehen.

Das GST-OmpD-His-Fusionsprotein wurde in *E. coli* produziert und mittels IMAC unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt.



**Abbildung 3.6: Aufreinigung von GST-OmpD-His**

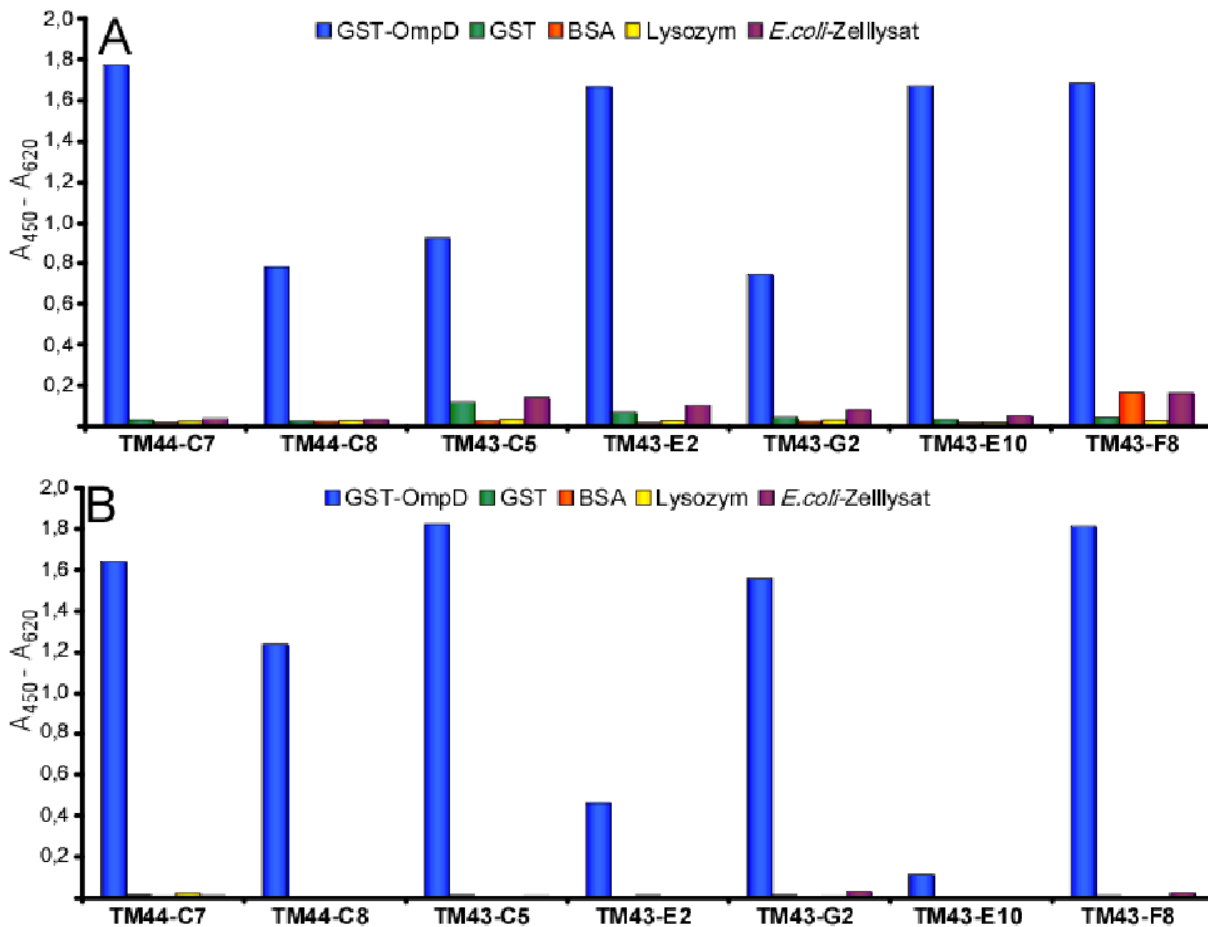
10 %iges SDS-PAA-Gel der Aufreinigung von GST-OmpD-His mittels IMAC mit Coomassie gefärbt. Aufgetragen wurden 17 µL je Probe. **M**: Massenstandard. Der Pfeil kennzeichnet die Zielproteinbande bei ca. 64 kDa.

Im Gegensatz zu der GST-OmpD-Proteinpräparation, die für das Panning eingesetzt wurde (Abbildung 3.2) waren nahezu keine Verunreinigungen im Proteingel nachzuweisen (Abbildung 3.6). Nach der Aufreinigung und der Dialyse gegen 2 M Harnstoff in PBS wurde die Proteinausbeute spektrometrisch bei A<sub>280</sub> bestimmt. Es wurden ca. 3,4 mg GST-OmpD-His<sub>6</sub> aus einer 200 mL Produktionskultur aufgereinigt.

### 3.2.5 Kreuzreaktionsassays mit aufgereinigtem GST-OmpD-His<sub>6</sub>

Die Genfragmente der acht isolierten scFv-Fragmente wurden für die lösliche Produktion im Schüttelkolben in den Expressionsvektor pOPE101-XP über die Schnittstellen *NcoI* und *NotI* kloniert, im 50 mL-SK-Maßstab in *E. coli* periplasmatisch produziert und mittels IMAC aufgereinigt. Parallel dazu wurden scFv-Phagen im 30 mL-Maßstab in *E. coli* produziert. Sowohl

die löslich produzierten scFv-Fragmente als auch die scFv-Phagenpartikel wurden für einen Kreuzreaktionstest eingesetzt (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: ELISA zur Analyse der Kreuzreaktion der isolierten scFv-Fragmente**

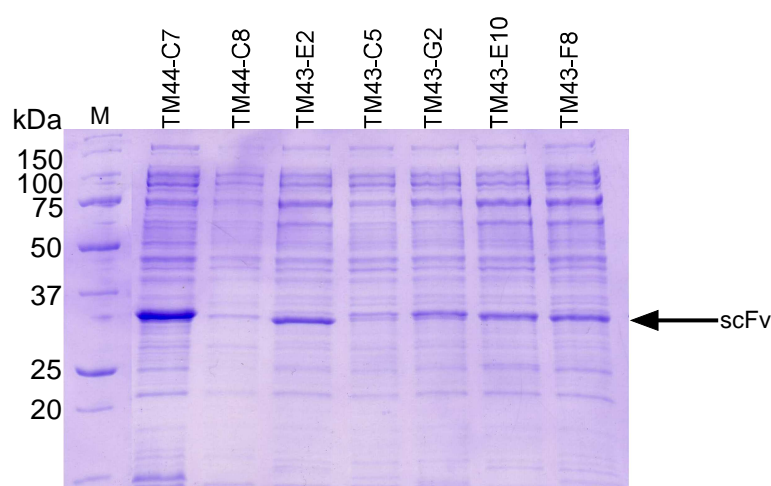
1  $\mu$ g/Kavität GST-OmpD, GST, BSA, Lysozym bzw. 100  $\mu$ L/Kavität des *E. coli*-Zelllysates wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. In A wurden  $1 \times 10^{10}$  scFv-Phagenpartikel je Kavität eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über Maus- $\alpha$ -M13-IgG-HRP (1:5000). In B wurden je Kavität 15  $\mu$ L des Ammoniumsulfats gefällten Überstandes aus der Produktion im 50 mL-Maßstab eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

Mit den Ergebnissen der ELISA-Analysen konnte die Spezifität der getesteten scFv-Fragmente auch auf aufgereinigtem GST-OmpD-His<sub>6</sub> nachgewiesen werden (Abbildung 3.7). Für lösliche, aufgereinigte scFv-Fragmente konnte im ELISA keine Kreuzreaktion mit GST, BSA, Lysozym oder *E. coli*-Zelllysate nachgewiesen werden. Die geringe Kreuzreaktion im Phagen-ELISA kann auf unspezifische Wechselwirkungen der Phagen zurückgeführt werden. Das Antikörperfragment TM43-E10 band als lösliches scFv-Fragment nur schwach an GST-OmpD-His<sub>6</sub>. Da im Phagen-ELISA das gleiche Antikörperfragment im Vergleich zu den anderen scFv-Fragmenten gut an das Antigen gebunden hat, wurde es dennoch weiter charakterisiert.



### 3.2.6 Produktion der isolierten scFv-Fragmente im 300 mL-Maßstab

Um zu überprüfen, ob zwischen den verschiedenen scFv-Fragmenten Unterschiede in der Produzierbarkeit bestehen, wurden die scFv-Fragmente im 300 mL-SK-Maßstab produziert. Nach der Produktion wurde die periplasmatische Fraktion isoliert und die im Kulturüberstand vorhandenen Antikörperfragmente mit Ammoniumsulfat gefällt. Nach der Vereinigung und Dialyse der beiden Fraktionen wurden die scFv-Fragmente mittels IMAC aufgereinigt (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: SDS-PAGE der Produktion der scFv-Fragmente**

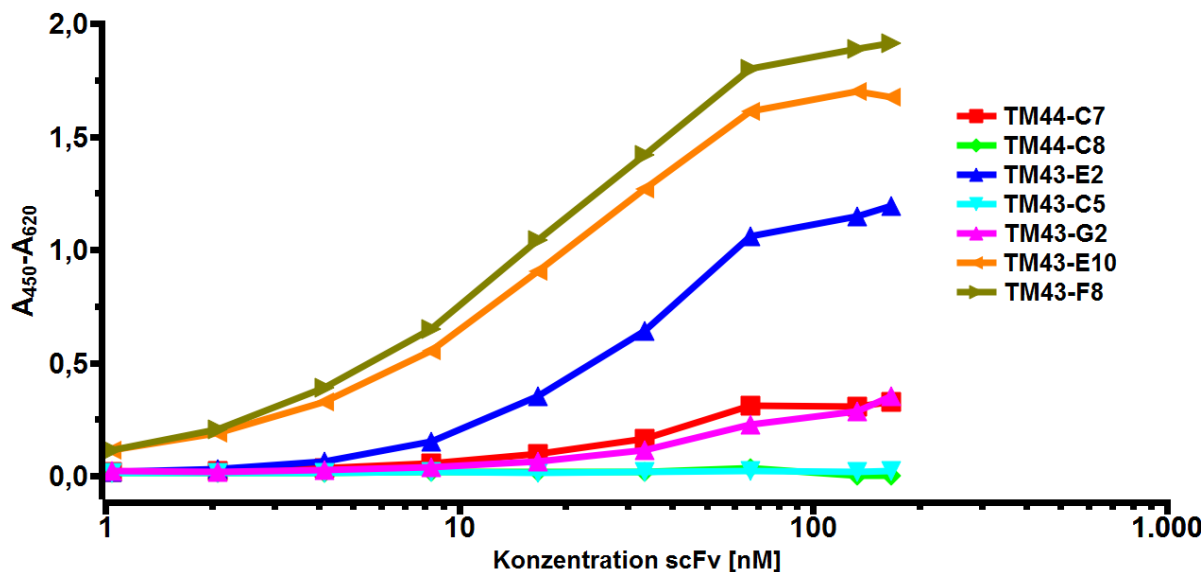
12 %iges SDS-PAA-Gel mit Coomassie gefärbt. Von den dialysierten und vereinigten Fraktionen der periplasmatischen Präparation und Ammoniumsulfatfällung wurden jeweils 10 µL je Probe aufgetragen. **M:** Massenstandard

Im Proteingel waren deutliche Unterschiede bezüglich der Produzierbarkeit der einzelnen scFv-Fragmente festzustellen. Die Proteinquantifizierung erfolgte densitometrisch. Die ermittelten Proteinausbeuten sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Das Antikörperfragment TM44-C7 wurde mit einer Ausbeute von 5,8 mg/L am besten produziert, die Antikörperfragmente TM44-C8 und TM43-C5 hingegen nur mit geringeren Ausbeuten.

**Tabelle 3.4: Proteinausbeuten nach der IMAC**

scFv-Fragment	Proteinausbeute [µg/L Produktionsvolumen]
TM44-C7	5800
TM44-C8	40
TM43-E2	182
TM43-C5	208
TM43-G2	178
TM43-E10	253
TM43-F8	481

Um die Antigenbindung der scFv-Klone näher zu untersuchen, wurde ein Titrations-ELISA mit definierten scFv-Konzentrationen durchgeführt (Abbildung 3.9)



**Abbildung 3.9: ELISA mit definierten scFv-Konzentrationen**

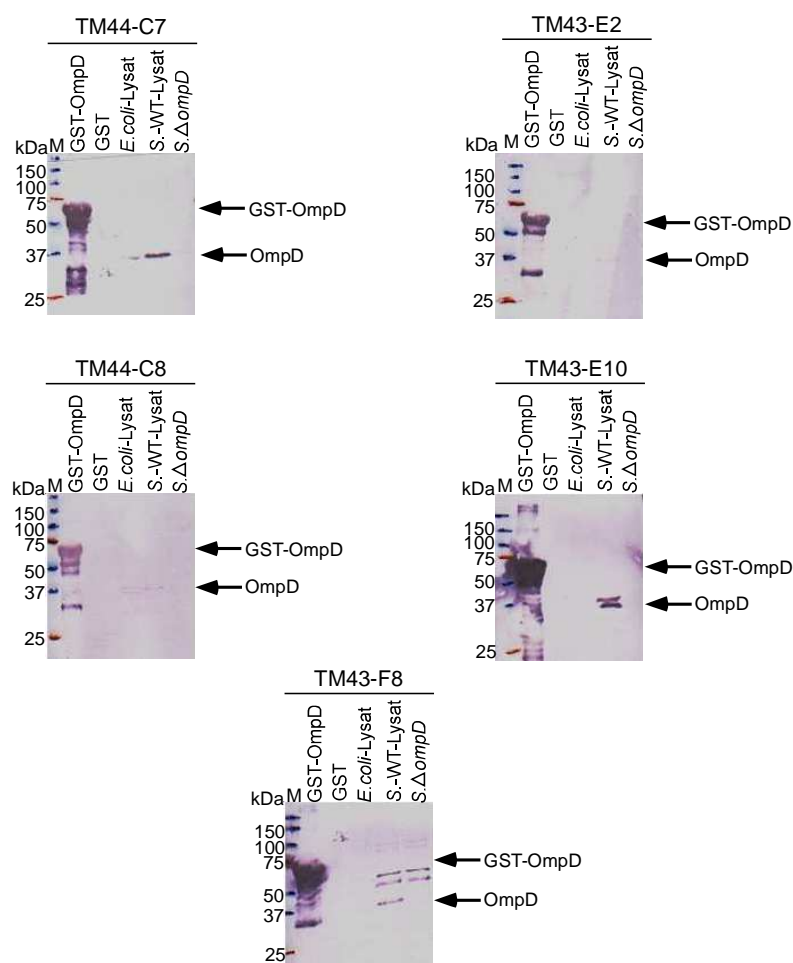
1 µg/Kavität GST-OmpD-His<sub>6</sub> wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Der Nachweis der eingesetzten scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus-α-c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege-α-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

Im ELISA mit definierten Konzentrationen wurden Unterschiede in der Antigenbindung an GST-OmpD-His<sub>6</sub> zwischen den einzelnen Antikörperfragmenten nachgewiesen. Für TM44-C8 und TM43-C5 wurde keine Antigenbindung nachgewiesen, was den Ergebnissen aus den Überständen widerspricht und möglicherweise daran liegt, dass diese Klone die Aufreinigung nicht überstanden. Für das scFv-Fragment TM44-C7 war nur eine schwache Bindung bei hohen Konzentrationen festzustellen. Dieses Antikörperfragment ließ sich zwar mit hohen Proteinausbeuten produzieren. Im konzentrationsabhängigen ELISA wurde jedoch keine hohe Antigenbindung nachgewiesen. Das höchste Signal im ELISA, auch bei niedrigen scFv-Konzentrationen, wurde für die scFv-Fragmente TM43-F8 und TM43-E10 gemessen. Diese Fragmente haben in Vergleich zu den Antikörperfragmenten TM43-C5, TM44-C7 und TM44-C8 eine höhere Affinität zu dem Zielantigen. Nach diesen Versuchen wurde mit den Antikörperfragmenten TM44-C8 und TM43-C5 nicht mehr weitergearbeitet, da sie sich weder gut produzieren lassen, noch eine gute Antigenbindung nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.7 Test der Spezifität mit Immunfärbung

Um zu untersuchen, ob die isolierten scFv-Fragmente ein lineares oder konformationelles Epitop erkennen, wurde die Bindung an GST-OmpD, GST, *E. coli*-, *Salmonella*-WT- und

*Salmonella*  $\Delta$ ompD-Zelllysate mittels Immunfärbung getestet. Da das Zielantigen GST-OmpD nur in denaturierter Form vorlag und so für das Panning eingesetzt wurde, war die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die isolierten scFv-Fragmente lineare Epitop erkennen.



**Abbildung 3.10: Immunfärbung zum Test der Spezifität**

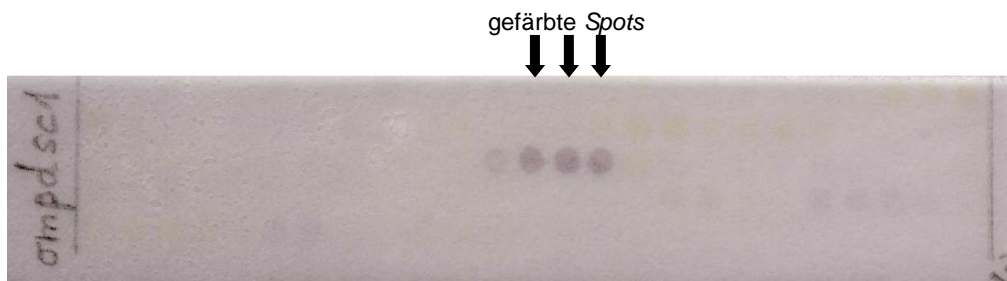
Je 1  $\mu$ g je rekombinantem Protein bzw. 10  $\mu$ L des Bakterienlysates wurden mittels 12 %iger SDS-PAA-Gel aufgetrennt und für den Western-Blot mit anschließender Immunfärbung verwendet. Je 4  $\mu$ g der scFv-Fragmente wurden pro Blot eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen Antikörperfragmente erfolgte über Maus- $\alpha$ -myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Als Substrat diente NBT/BCIP (je 1:100). M: Massenstandard

Die fünf getesteten scFv-Fragmente banden in der Immunfärbung nicht unspezifisch an GST oder *E. coli*-Zelllysate. Alle Fragmente banden das Zielantigen GST-OmpD, das eine molekulare Masse von ca. 64 kDa besitzt. In der Immunfärbung wurden auch Abbauprodukte des Zielproteins, die je nach eingesetztem scFv-Fragment ein anderes Bandenmuster ergaben, nachgewiesen. Dass es sich um Abbauprodukte des Zielproteins handelte, wurde auch mit einer Immunfärbung mit dem Antikörper Maus- $\alpha$ -His<sub>5</sub>-IgG nachgewiesen (siehe Anhang). Alle scFv-Fragmente erkannten auch das Protein aus dem *Salmonella*-WT-Lysat, das eine molare Masse von 34 kDa hat. Die Deletionsmutante wurde hingegen nicht erkannt. Die Antikörperfragmente banden unterschiedlich stark an das OmpD im Zelllysate. Für die Fragmente

TM44-C7 und TM43-E10 wurde die stärkste Bindung in der Immunfärbung nachgewiesen. TM43-G2 und TM43-E2 banden nur sehr schwach und das scFv-Fragment TM43-F8 erkannte zwei weitere Proteine, die sowohl im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante vorhanden waren.

#### 3.2.8 Epitopkartierung

Da nachgewiesen wurde, dass die isolierten scFv-Fragmente lineare Epitope erkennen, wurde eine Epitopkartierung mittels Peptidmembran durchgeführt. Auf der Membran waren 15 Aminosäuren lange Peptide des OmpD-Proteins mit einem 3er Versatz der Aminosäuren synthetisiert (Ronald Frank, HZI Braunschweig). Für die Epitopkartierung wurden die isolierten Antikörperfragmente wie für eine Immunfärbung eingesetzt.



**Abbildung 3.11: Epitopkartierung mittels Peptidmembran**

Epitopkartierung des scFv-Klons TM43-G2. Es wurden 4 µg des scFv-Fragmentes verwendet. Der Nachweis erfolgte mit Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Als Substrat wurde MTT/BCIP-Färbelösung verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die drei gefärbten Peptid-Spots.

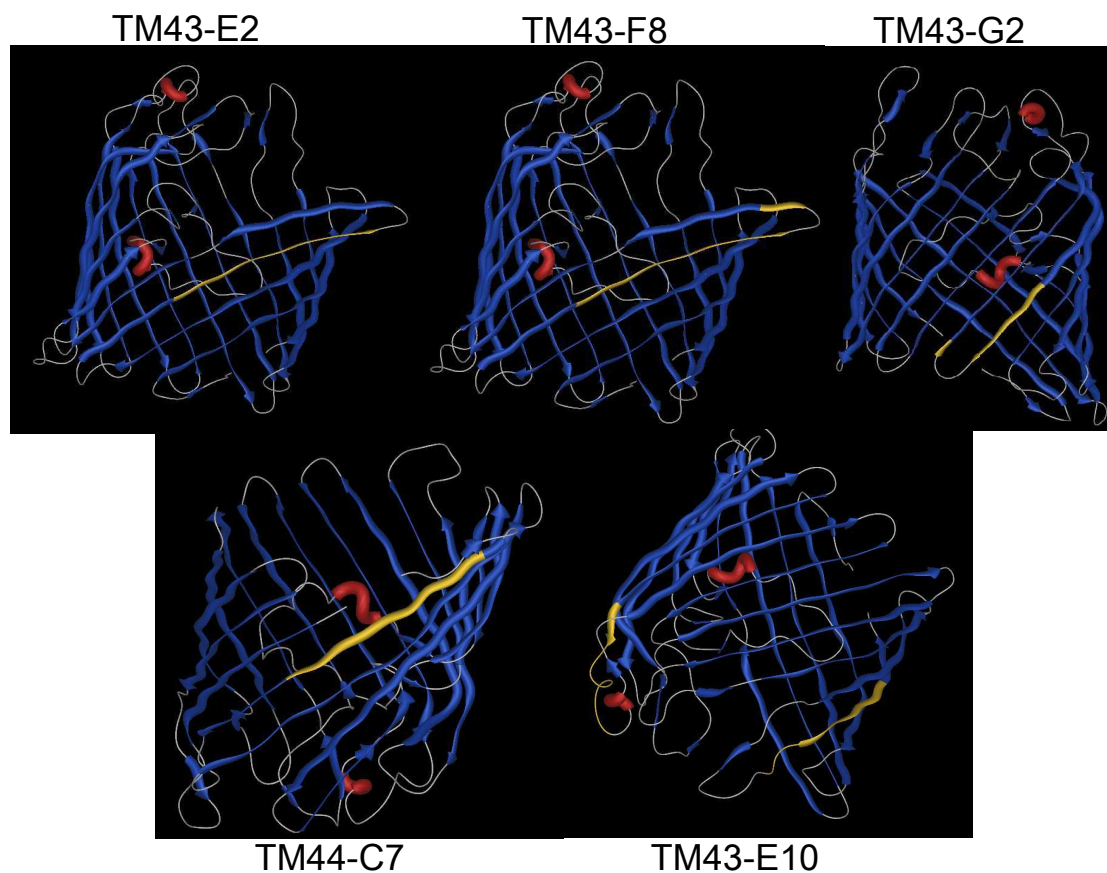
Das Ergebnis der Epitopkartierung des scFv-Fragmentes TM43-G2 ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Anhand der gefärbten *spots* und der zugehörigen Peptidsequenz wurden die antigenen Determinanten der untersuchten scFv-Fragmente bestimmt. Je nachdem wie viele Peptidspots angefärbt wurden, wurde aus dem überlappenden Bereich der Peptidsequenzen das Epitop bestimmt. Die Ergebnisse für die scFv-Klone sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

**Tabelle 3.5: Aminosäuresequenzen der Epitope**

Der überlappende Bereich, der das Epitop der scFv-Klone repräsentiert wurde fett dargestellt

scFv-Fragment	spot-Nr.	Epitopsequenz
TM44-C7	9	YNKDG <b>NKLDLYGKVH</b>
	10	DGN <b>KLDLYGKVH</b> AQH
	11	<b>KLDLYGKVH</b> AQHYFS
TM43-E2	25	GFG <b>QWEYEFKGNRTE</b>
	26	<b>QWEYEFKGNRTE</b> SQG
TM43-E10	69	AAYAK <b>SDRTNNQVKA</b>
	70	AK <b>SDRTNNQVKA</b> ASN
	71	<b>DRTNNQVKA</b> ASNLNA
	115	TKAAK <b>VSTDNIVAVG</b>
	116	AK <b>VSTDNIVAVG</b> LNLY
	117	<b>VSTDNIVAVG</b> LNLYQF
TM43-G2	63	GDGFGL <b>SATYEYEGF</b>
	64	FGL <b>SATYEYEGF</b> GVG
	65	<b>SATYEYEGF</b> GVGAAY
TM43-F8	26	<b>QWEYEFKGNRTE</b> SQG

Bei Verwendung des scFv-Fragments TM44-C7 wurden drei *spots* angefärbt. Somit konnte ein 9 Aminosäuren langer Bereich für dieses Epitop eingegrenzt werden. Der TM43-E2 erkannte hingegen einen Bereich von 12 Aminosäuren, da nur eine Bindung an zwei Spots nachgewiesen werden konnte und somit die für eine Bindung erforderliche Aminosäuresequenz nicht genau bestimmt werden kann. Eine eindeutige Bestimmung des Epitops des scFv-Fragments TM43-E10 war nicht möglich, da sowohl die *spots* mit den Nummern 69, 70 und 71 als auch die *spots* mit den Nummern 115, 116, 117 gefärbt wurden. Die *spots* 69, 70 und 71 waren aber wesentlich stärker gefärbt als die *spots* mit den Nummern 115, 116, 117. Die schwächere Färbung dieser *spots* ließ eine unspezifische Bindung nicht ausschließen. Mit Hilfe eines Homologiemodells des OmpD-Monomers wurden die Strukturbereiche, in denen die erkannten Epitope liegen, definiert und in Abbildung 3.12 dargestellt.

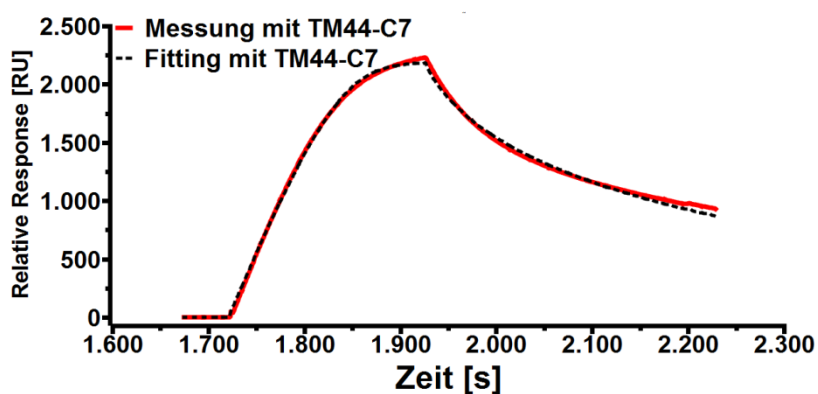


**Abbildung 3.12: 3D-Struktur des OmpD-Monomers**

Dargestellt ist das OmpD-Monomer aus verschiedenen Blickrichtungen. Die 3D-Struktur wurde als pdb-Datei von der Internetseite Expasy verwendet. Blau dargestellt sind  $\beta$ -Faltblätter. Rot sind  $\alpha$ -Helices. Die von den entsprechenden scFv-Fragmenten erkannten lineare Epitope wurden gelb markiert.

### 3.2.9 Oberflächenplasmonresonanzmessung mit dem scFv-Fragment TM44-C7

Die Affinität des scFv-Fragments TM44-C7 wurde mittels Oberflächenplasmonresonanzmessung (SPR) auf dem OmpD1-Peptid bestimmt, das als 22mer Peptid von Ronald Frank (HZI, Braunschweig) zur Verfügung gestellt wurde und das Epitop dieses scFv-Klons repräsentiert.



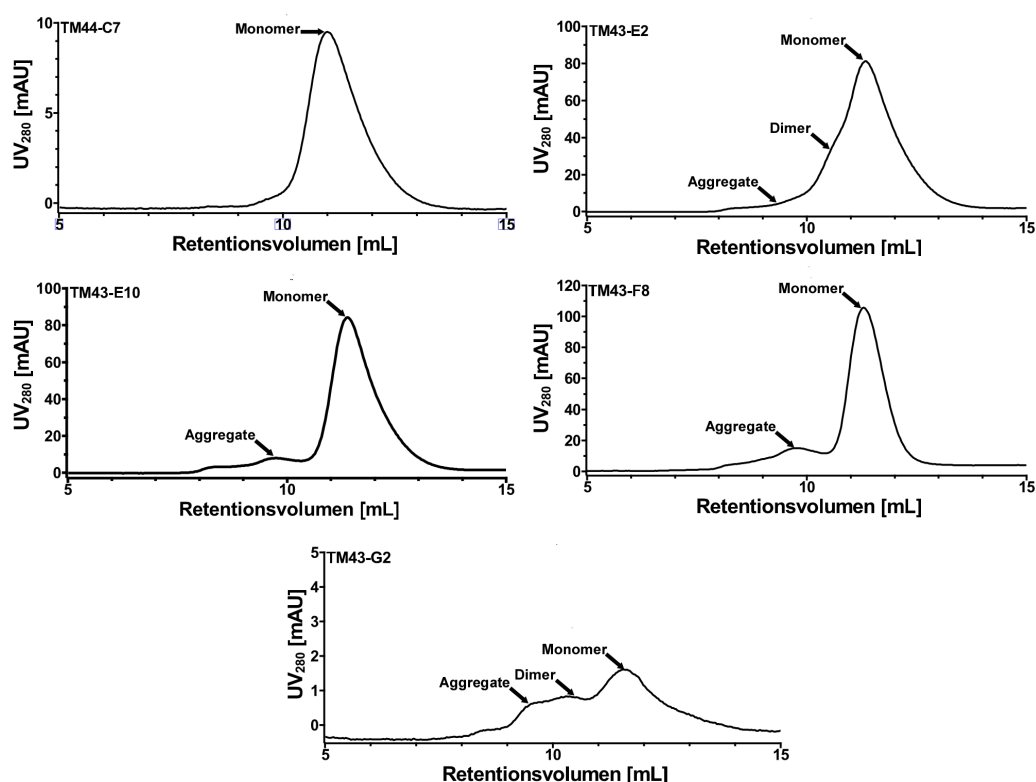
**Abbildung 3.13: SPR-Analyse mit TM44-C7**

Die Messung erfolgte auf einem CM5-Chip, auf dem ca. 2000 RU des OmpD1-Peptids gekoppelt wurde. Als Referenz diente das Sherk2-Peptid, von dem ebenfalls mit ca. 2000 RU gekoppelt wurde. Der Analyt wurde mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/mL}$  und einer Flussrate von 50  $\mu\text{L/min}$  über den Liganden geleitet.

Für das scFv-Fragment TM44-C7 wurde mittels Langmuir 1:1 mit Massentransfer-*fitting* eine Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D = 1,22 \times 10^{-7}$  M bestimmt. Als Auswertungsmodell wurde eine 1:1 Bindung angenommen, da das scFv-Fragment nur eine Bindungsstelle besitzt. Der Massentransfer wurde berücksichtigt, da der Sensorchip sehr dicht mit dem OmpD1-Peptid beladen war. Bei einer dichten Beladung des Chips mit dem OmpD1-Peptid besteht die Möglichkeit, dass ein scFv-Fragment, nachdem es sich vom Antigen gelöst hat, erneut eine Bindung mit dem Peptid eingeht. Eine kinetische Messung mit geringeren Peptidmengen auf dem Chip war nicht möglich, da keine ausreichenden Messsignale erzielt wurden.

### 3.2.10 Größenausschlusschromatographie

Antikörperfragmente, insbesondere scFv-Fragmente können zur Aggregatbildung neigen, wodurch deren Stabilität gesenkt und ihr Bindungsverhalten negativ beeinflusst werden kann. Deshalb wurden die isolierten scFv-Fragmente mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) auf ihre Aggregatbildung hin getestet.



**Abbildung 3.14: Größenausschlusschromatographie der scFv-Fragmente**

Chromatogramme der SEC mit einer Superdex75 10-300GL. Als Laufpuffer wurde PBS verwendet. Es wurden je 500 µL der Probe aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 mL/min. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm korreliert mit dem Retentionsvolumen. Die Ordinaten wurden entsprechend der Absorptionswerte der einzelnen scFv-Fragmente skaliert.

Bis auf das scFv-Fragment TM43-G2 bildeten die scFv-Fragmente TM44-C7, TM43-E2, TM43-E10 und TM43-F8 nur in einem geringen Maße Dimere oder andere Aggregatstrukturen. Der TM44-C7 lag ausschließlich als Monomer vor und bildete auch nach längerer Lagerung keine Aggregate. TM43-F8 und TM43-E10 lagen hauptsächlich als Monomer vor und bildeten nur zu einem geringen Anteil Aggregate. Bei dem scFv-Fragment TM43-E2 war im Chromatogramm der SEC ein geringer Anteil an Dimeren festzustellen, während das scFv-Fragment TM43-G2 einen Großteil an Dimeren und anderen Aggregaten bildete. Bei letzterem scFv-Fragment war auch die gemessene Absorption  $A_{280}$  sehr gering, da es sich nicht in höheren Konzentrationen produzieren ließ (Abbildung 3.14).

### 3.3 Etablierung eines Kompetitions-ELISA für die Diagnostik

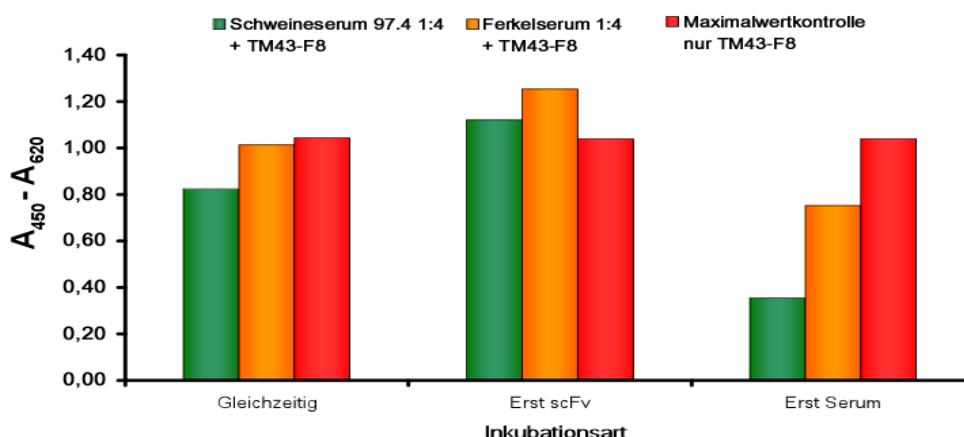
Die isolierten scFv-Fragmente wurden auf ihre Eignung für einen kompetitiven ELISA zur veterinären serologischen Diagnostik getestet. Das Zielantigen GST-OmpD-His<sub>6</sub> wurde an die Festphase einer 96er Polystyrol-Mikrotiterplatte gebunden. Anschließend erfolgte die Inkubation des scFv-Fragments und des zu testenden Schweineserum. Die Farbreaktion erfolgte über den Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente mit Hilfe des Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 und als Sekundärantikörper den Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG Fab-spez. HRP. Das Testprinzip beruht auf der Konkurrenz der scFv-Fragmente mit den Serumantikörpern um dasselbe Antigen. Der Nachweis wurde über das scFv-Fragment geführt, so dass bei dem Einsatz eines positiven Serums eine Absenkung des Signals in Bezug auf die Maximalwertkontrolle erwartet wurde. Die Maximalwertkontrolle war hier das scFv-Fragment ohne Serum auf dem Zielantigen.

#### 3.3.1 Test der Inkubationsreihenfolge im ELISA

Mittels Titrations-ELISAs wurde sowohl die Antigenmenge als auch die Menge an eingesetztem scFv-Fragment, die für das Erreichen einer  $OD_{450} \approx 1,0$  (linearer Bereich) benötigt wurden, bestimmt (Daten nicht gezeigt). Anhand der Ergebnisse aus diesen Messungen wurden folgende Parameter festgelegt: Für die Etablierung des kompetitiven ELISA wurden 100 ng GST-OmpD pro Kavität und die Seren, die aus einem Impfversuch in Dessau stammen, in einer Verdünnung von 1:4 eingesetzt. Die scFv-Fragmente wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Die Menge der benutzten scFv-Fragmente richtete sich zum einen nach dem scFv-Klon selbst und zum anderen nach der Produktionscharge. Je nach scFv-



Fragment wurden 100 bis 500 ng/Kavität eingesetzt. Zuerst wurde untersucht, ob die Inkubationsreihenfolge eine Auswirkung auf die Konkurrenz von scFv und Serum hat.



**Abbildung 3.15: Test der Inkubationsreihenfolge im ELISA mit Konkurrenz**

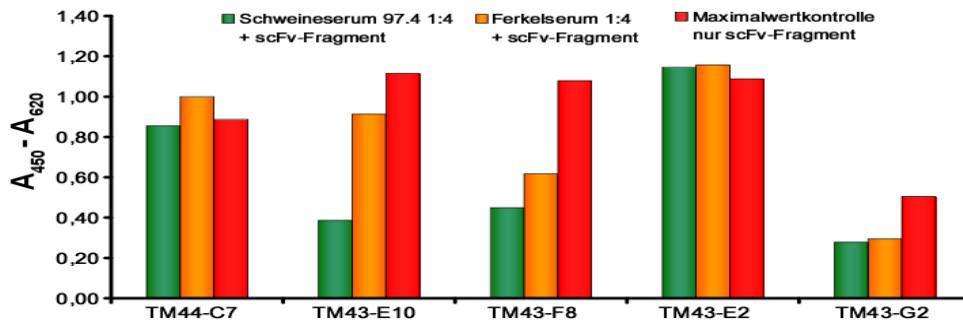
Es wurden 100 ng/Kavität GST-OmpD-His<sub>6</sub> in Carbonatpuffer an eine Nunc Polysorpplatte gekoppelt. Eingesetzt wurden 300 ng/Kavität des scFv-Fragment TM43-F8. Als Seren wurde das Ferkelserum als Negativserum 1:4 und das Serum 97.4 als Positivserum 1:4 verwendet. Der Nachweis der eingesetzten scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus IgG (Fab-spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB. Dieser ELISA wurde im Rahmen einer betreuten Bachelorarbeit von Jana Glindemann durchgeführt. Alle Messergebnisse wurden als Duplikate angefertigt und der Mittelwert dargestellt.

Wie in Abbildung 3.15 ersichtlich hatte die Inkubationsreihenfolge einen Einfluss auf die Konkurrenz. Wenn Serum und scFv gleichzeitig auf das Zielantigen gegeben wurden, war kein kompetitiver Effekt im ELISA zu verzeichnen. Auch wenn das scFv-Fragment 1 h vor dem Serum inkubiert wurde, war keine Konkurrenz in Bezug auf die Maximalwertkontrolle festzustellen. Wenn hingegen erst das Serum 1 h auf dem Zielantigen inkubiert und anschließend das scFv-Fragment hinzugegeben wurde, war eine Konkurrenz bei Verwendung des Positivserums festzustellen. Bei dieser Inkubationsreihenfolge wurde jedoch auch bei dem als negativ definierten Ferkelserum eine Konkurrenz nachgewiesen. In ELISAs, in denen nur das Ferkelserum auf dem Antigen mit Ziege- $\alpha$ -Schwein-IgG (H+L) HRP-Konjugat getestet wurde, konnten GST-OmpD-His<sub>6</sub>-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass das Ferkelserum nicht frei von  $\alpha$ -GST-OmpD Antikörpern war (Daten nicht gezeigt).

Für die weiteren ELISAs wurde das Serum zeitlich immer vor den scFv-Fragmenten inkubiert.

### 3.3.2 Test verschiedener scFv-Fragmente im kompetitiven ELISA

Nachdem auch die Inkubationsreihenfolge festgelegt worden war, wurden die isolierten Antikörperfragmente auf ihre kompetitiven Eigenschaften im ELISA untersucht.



**Abbildung 3.16: Kompetitiver ELISA der isolierten scFv-Fragmenten und Tierseren**

Es wurden 100 ng/Kavität GST-OmpD-His<sub>6</sub> in Carbonatpuffer an eine Nunc Polysorpplatte gekoppelt. Von den scFv-Fragmenten wurden folgende Mengen pro Kavität eingesetzt: **TM44-C7: 500 ng; TM43-E10: 200 ng; TM43-F8: 100 ng; TM43-E2: 50 ng und TM43-G2: 200 ng**. Als Seren wurde das Ferkelserum als Negativserum 1:4 und das Serum 97.4 als Positivserum 1:4 verwendet. Der Nachweis der eingesetzten scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus IgG (Fab-spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB. Dieser ELISA wurde im Rahmen einer betreuten Bachelorarbeit von Jana Glindemann durchgeführt. Alle Messergebnisse wurden als Duplikate angefertigt und der Mittelwert dargestellt.

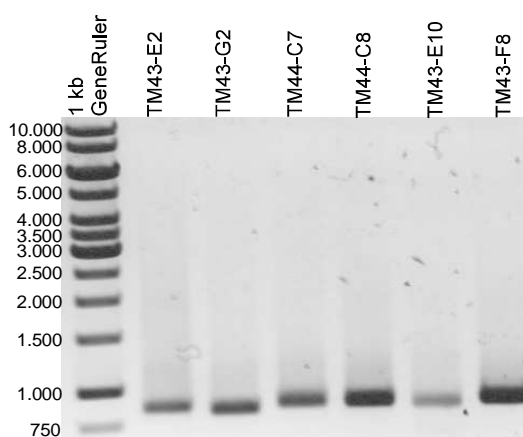
Bei der Verwendung der scFv-Fragmente TM44-C7 und TM43-E2 war keine Konkurrenz in Bezug auf die Maximalwertkontrolle erkennbar. Bei der Verwendung des scFv-Fragments TM43-G2 war eine Abschwächung des Messsignals verglichen mit der Maximalwertkontrolle nachweisbar. Die Maximalwertkontrolle erreicht jedoch nur einen Wert von 0,4 und sowohl das Positivserum 97.4 als auch das Ferkelserum ergaben eine ähnlich starke Konkurrenz. Bei den scFv-Fragmenten TM43-E10 und TM43-F8 war eine Konkurrenz festzustellen (Abbildung 3.16). Das Messsignal mit Positivserum war um 65 % bzw. 59 % im Vergleich zur Maximalwertkontrolle reduziert. Somit wurde festgestellt, dass die im Serum vorhandenen Antikörper mit den scFv-Fragmenten um ein Epitop konkurrieren. Wie im ELISA, der in Abbildung 3.15 dargestellt ist, bereits festgestellt wurde, war auch bei der Verwendung des Ferkelserums ein kompetitiver Effekt festzustellen. Die Konkurrenz durch das Ferkelserum fiel geringer aus als bei dem Serum 97.4. Das bessere Signalverhältnis zwischen Maximalwertkontrolle, Serum 97.4 und Ferkelserum wurde bei Verwendung des scFv-Fragments TM43-E10 festgestellt. Beim Serum 97.4 war eine Reduzierung um 65 % zum Maximalwert festzustellen.

### 3.4 Verbesserung der scFv-Fragmente mittels *error-prone*-PCR

Um für die Entwicklung eines diagnostischen, kompetitiven ELISAs auf ein größeres Repertoire von geeigneten scFv-Fragmenten zurückgreifen zu können, wurden die in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten scFv-Fragmente mittels *error-prone*-PCR mutagenisiert. Das Einfügen ungerichteter Mutationen und die anschließende Selektion unter stringenten Bedingungen kann eine erhöhte Affinität des scFv-Fragments, eine verbesserte Produzierbarkeit und erhöhte Stabilität bei den scFv-Mutanten hervorbringen.

#### 3.4.1 Erzeugung der mutierten Subbibliotheken

Die scFv-Fragmente TM44-C7, TM44-C8, TM43-G2, TM43-E2, TM43-E10 und TM43-F8 wurden als Grundlage für die Generierung von mutagenisierten scFv-Genbibliotheken verwendet. Es wurden insgesamt fünf Mutagenisierungszyklen durchgeführt, in denen mittels PCR und flankierenden Oligonukleotidpaaren ungerichtet Mutationen in die scFv-Genabschnitte eingefügt wurden.



**Abbildung 3.17: DNA-Agarosegel nach der 5. Mutagenisierungsrunde**

Dargestellt ist ein 0,8 %iges Agarosegel. Es wurden jeweils 5  $\mu$ L des PCR-Ansatzes je Probe aufgetragen. Vom Marker wurden 4  $\mu$ L aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 140 V für 30 min. Die erwartete Bandengröße lag bei ca. 900 bp.

Je eingesetztem scFv-Fragment war eine Bande der Größe von ca. 900 bp zu erkennen. Nach der fünften *error-prone*-PCR wurden die mutierten Genabschnitte der scFv-Fragmente für die Erzeugung von 6 Subbibliotheken eingesetzt. Für die Klonierung wurde der pHAL14-Vektor verwendet. Die erzeugten Subbibliotheken wurden mittels Kolonie-PCR auf ihre *insert*-Qualität hin untersucht.

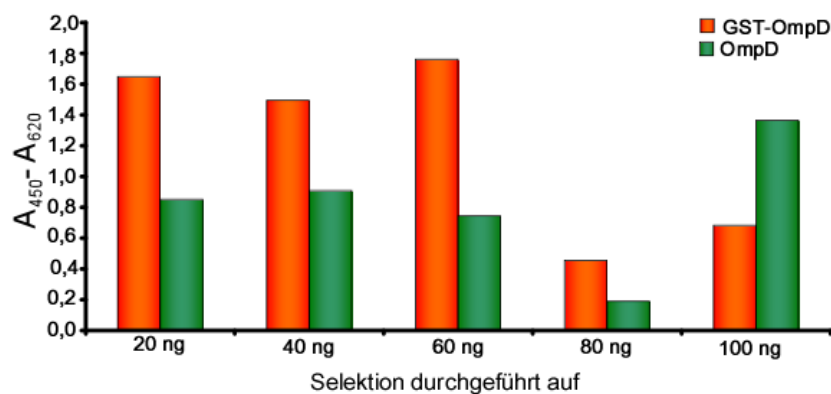
**Tabelle 3.6: Subbibliotheken nach der *error-prone*-PCR**

Dargestellt sind die einzelnen Subbibliotheken, die Häufigkeit, mit der ein *insert* voller Länge nachgewiesen wurde und der Titer nach der Amplifikation

Subbibliothek	Qualität ( <i>insert</i> [%])	Phagentiter nach Ampl. [cfu]
TM105-TM43-E2	50	$1,0 \times 10^{14}$
TM105-TM43-G2	10	$7,8 \times 10^{13}$
TM105-TM44-C7	40	$8,2 \times 10^{13}$
TM105-TM44-C8	60	$2,8 \times 10^{13}$
TM105-TM43-E10	20	$1,1 \times 10^{14}$
TM105-TM43-F8	75	$2,2 \times 10^{13}$

### 3.4.2 Selektion der Subbibliotheken auf OmpD

Nach der Selektion von spezifisch bindenden Antikörperphagen wurde die Anreicherung von bindenden Antikörperphagen mittels polyklonalem Phagen-ELISA überprüft (Abbildung 3.18).

**Abbildung 3.18: Polyklonaler Antikörperphagen-ELISA**

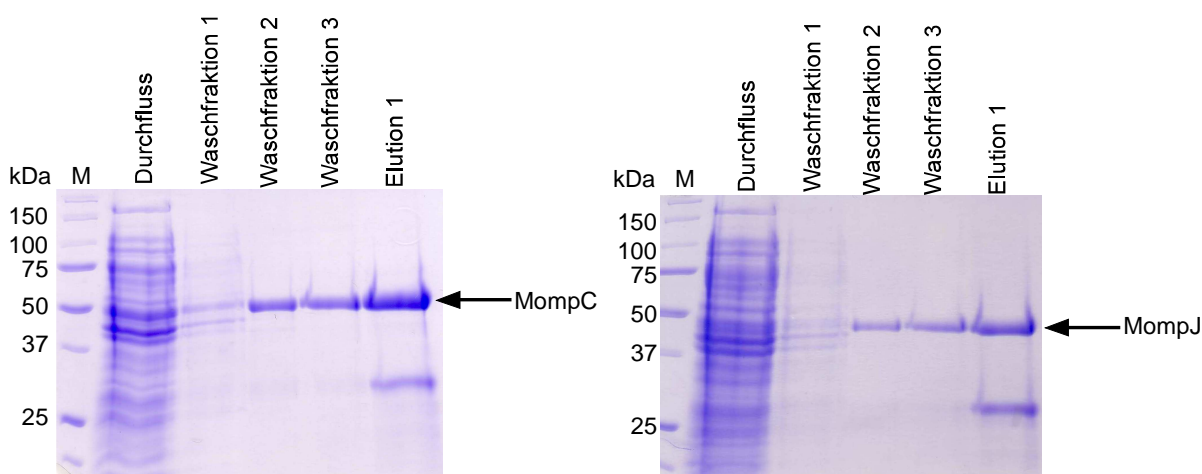
Im dargestellten ELISA wurden je Kavität 200 ng GST-OmpD-His<sub>6</sub> (aus eigener Produktion) bzw. OmpD ohne GST-Fusion (Produktion IvD, Hannover) gekoppelt. Die Inkubation der Antikörperphagen erfolgte aus den unterschiedlichen Selektionsansätzen. Es wurden ca.  $1 \times 10^{11}$  Phagen/Kavität eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über Maus- $\alpha$ -M13-IgG HRP-Konjugat (1:5000). Substrat: TMB.

Durch die Selektion der mutagenisierten scFv-Fragmente wurden OmpD bindende Antikörperphagen angereichert. Auf GST-OmpD-His<sub>6</sub> als Zielantigen wurden höhere Messwerte erreicht als auf dem OmpD ohne GST-Fusion, das aus einer Produktion mit dem pTopoTrcHis-Vektor stammt. Da die weitere Testentwicklung auf dem OmpD Protein ohne GST-Fusion durchgeführt werden sollte, wurden die weiteren Versuche nur mit dem OmpD-Protein durchgeführt.

### 3.5 Isolation von *Campylobacter*-spezifischen scFv-Fragmenten

#### 3.5.1 Expression von *Campylobacter*-Antigenen

Neben der Isolation von *Salmonellen*- bzw. OmpD-spezifischen scFv-Fragmenten wurden in dieser Arbeit auch *Campylobacter*-spezifische scFv-Fragmente isoliert und ihre Eignung für einen kompetitiven ELISA für die Diagnostik untersucht. Die Identifizierung geeigneter immunogener Proteine wurde von der IVD in Zusammenarbeit mit dem Mikrobiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover vorgenommen. Es wurden zwei potentielle Zielproteine identifiziert, das *major outer membrane protein* von *Campylobacter coli* (MompC) und *Campylobacter jejuni* (MompJ). Die Klonierung der Genabschnitte der Zielproteine erfolgte aus dem *Campylobacter*-Genom in den pTopo-TrcHis Expressionsvektor, um die Proteine rekombinant in *E. coli* herstellen zu können. Die Klonierung wurde ebenfalls von der IVD GmbH in Hannover durchgeführt. Die Proteine MompC und MompJ wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19: Aufreinigung der *Campylobacter*-Antigene**

Dargestellt sind die Coomassie gefärbten SDS PAA-Gele der Aufreinigungen von MompC und MompJ. Es wurden 12 %ige SDS-PAA-Gele mit jeweils 17  $\mu$ L der entsprechenden Probe beladen. M: Proteinmassenstandard (4  $\mu$ L). Der Pfeil kennzeichnet jeweils die Bande des Zielantigens.

Nach der Aufreinigung wurden die Antigene, zur Reduktion der Harnstoffkonzentration, gegen 2 M Harnstoff in PBS dialysiert und die Proteinkonzentration spektrometrisch bei  $A_{280}$  bestimmt. Die Gesamtproteinausbeute von MompC betrug 780  $\mu$ g und von MompJ 580  $\mu$ g. 230  $\mu$ g von MompC und 185  $\mu$ g von MompJ waren auch in PBS ohne Harnstoff löslich und wurden für das zweite Panning eingesetzt.

### 3.5.2 1. Panning auf rekombinantem MompC und MompJ

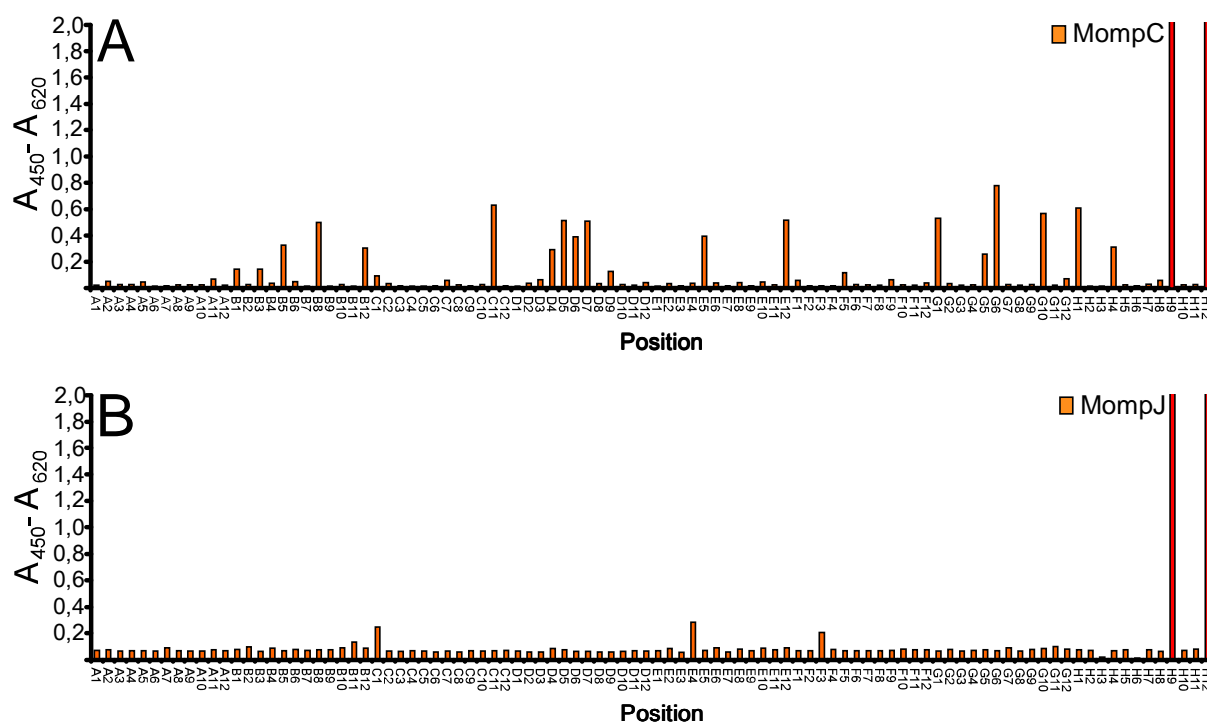
Die produzierten und aufgereinigten Antigene wurden nach der Dialyse und Konzentrationsbestimmung für ein Panning mit der HAL4- und HAL7-Antikörpergen-bibliothek verwendet. Aufgrund der Ergebnisse aus dem Panning auf GST-OmpD wurde dieses Panning mit veränderten Parametern durchgeführt. Die beiden Bibliotheken wurden vor der Inkubation auf dem Zielantigen zu gleichen Teilen gemischt. Weiterhin wurden für die erste Runde nur *Hyperphage* verpackte Bibliotheken eingesetzt, wodurch ein multivalentes Display ermöglicht wurde. Diese Vorgehensweise vereinfachte die Durchführung und die spätere Analyse, da die Bibliotheken nicht getrennt eingesetzt wurden und mit geringerem Aufwand selektiert werden konnten. Aus welcher Bibliothek ein scFv-Klon isoliert wurde, konnte anhand der Sequenzierung bestimmt werden.

**Tabelle 3.7: Parameter für das Panning auf MompC und MompJ**

Versuchsnr	Antigen	Bibliothek	Verpackung	Präinkubation
TM78.1	MompC	HAL4/ 7	Hyperphage	1 % Milchpulver, 1% BSA, 40 $\mu$ L
TM78.2	MompJ	HAL4/ 7	Hyperphage	1 mL <i>E. coli</i> -Lysat in 10 mL PBS-T

### 3.5.3 Analyse von monoklonalen, löslichen scFv-Fragmenten

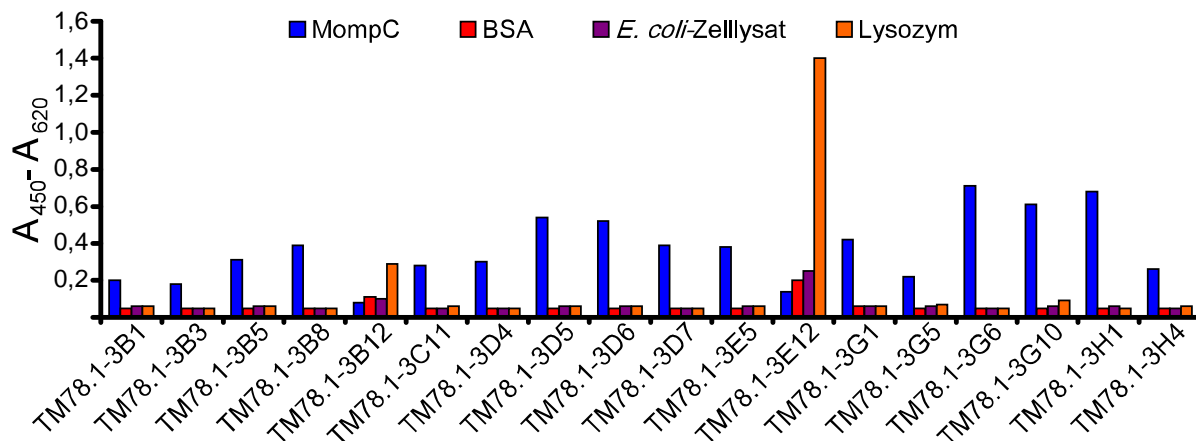
Es wurden insgesamt drei Selektionsrunden durchgeführt. In der ersten Runde wurden je 10  $\mu$ g Antigen, für die weiteren Runden jeweils 1  $\mu$ g Antigen eingesetzt. Nach der dritten Selektionsrunde wurden insgesamt 184 Einzelkolonien isoliert und für die Produktion von monoklonalen scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten verwendet. Mittels ELISA wurden sie anschließend auf ihre Bindungseigenschaften an MompC und MompJ hin untersucht.



**Abbildung 3.20: ELISA mit scFv-Fragmenten aus der 3. Selektionsrunde**

1 µg/Kavität MompC bzw. MompJ wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Positivkontrolle ist der  $\alpha$ -Lysozym-D1.3-scFv (TB32-2) in H9 und H12. Der Nachweis der aus 20 µL MTP-Produktionskulturüberstand gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB. Aufgrund der geringen Messergebnisse und zur besseren Skalierung wurde die Ordinate und damit die Messwerte der Positivkontrolle bei 2,0 gekappt. Messwerte der Positivkontrolle waren 3,7.

Die Anreicherung von spezifischen scFv-Klonen hat funktioniert (Abbildung 3.20A). Gegen MompJ konnte in diesem Panning kein scFv-Fragment isoliert werden (Abbildung 3.20B). Im ELISA mit MompC als Antigen wurde für ca. 15 Einzelklone eine Bindung nachgewiesen. Die scFv-Fragmente, für die eine Bindung an MompC festgestellt wurde, wurden erneut in Mikrotiterplatten produziert und im ELISA auf ihre Spezifität und Kreuzreaktion mit anderen Antigenen untersucht (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: ELISA mit ausgesuchten scFv-Fragmenten aus der 3. Selektionsrunde**

1 µg/Kavität MompC, BSA, Lysozym bzw. 100 µL des *E. coli*-Zelllysates wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Der Nachweis der aus 20 µL MTP-Produktionskulturüberstand gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus-α-c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege-α-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

Die getesteten scFv-Fragmente banden, bis auf TM78.1.3-B12 und TM78.1.3-E12, spezifisch an MompC. Die Absorptionswerte im ELISA sind generell sehr niedrig, so dass scFv-Fragmente, die im ELISA ein Signal von über 0,4 ergaben, sequenziert wurden.

### 3.5.4 Sequenzierung der isolierten scFv-Klone des 1. Pannings

Es wurden fünf Antikörperfragmente aus der dritten Panningrunde sequenziert. Die Sequenzdaten wurden mit der Software Finch TV und der Datenbank VBASE2 (Retter et al., 2005) ausgewertet. Die scFv-Fragmente TM78.1.3-D5, TM78.1.3-D6, und TM78.1.3-G10 waren sequenzverschiedene Einzelklone. Die Klone TM78.1.3-G6 und TM78.1.3-H1 waren sequenzidentisch zu TM78.1.3-G10 und wurden in dieser Arbeit nicht weiter verwendet. Die drei isolierten scFv-Klone gehörten der λ-Unterfamilie an und wurden aus der HAL7-Bibliothek isoliert.

Die vollständigen Sequenzdaten werden aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

### 3.5.5 2. Panning auf rekombinantem MompC und MompJ

Im ersten Panning wurden nur drei unterschiedliche scFv-Fragmente gegen MompC und kein Antikörperfragment gegen MompJ isoliert. Aus diesem Grund wurde das Panning wiederholt. Es wurden vier verschiedene Ansätze zur Isolierung von spezifischen scFv-Fragmenten verfolgt. Im Gegensatz zum ersten Panning wurden bei dieser Selektion auch die Zielproteine



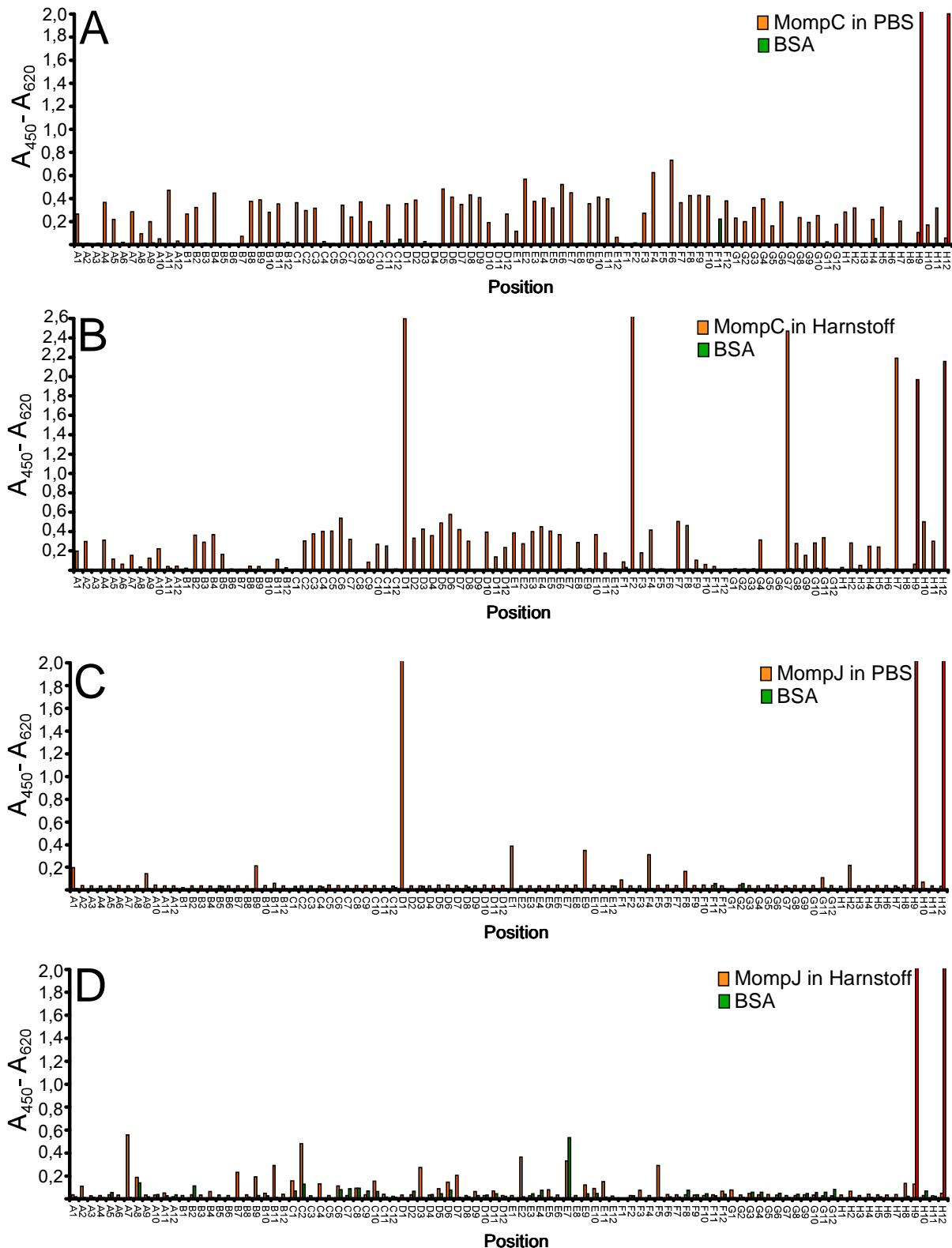
MompC und MompJ verwendet, die in PBS ohne Harnstoff löslich waren. Die anderen Parameter wurden nicht geändert. Es wurden drei Selektionsrunden durchgeführt.

**Tabelle 3.8: Parameter für das Panning auf MompC und MompJ**

Versuchsnr	Antigen	Bibliothek	Verpackung	Präinkubation
TM80	MompC inPBS	HAL4/7	Hyperphage	1 % Milchpulver,
TM81	MompC in 2 M Harnstoff	HAL4/7	Hyperphage	1% BSA, 40 $\mu$ L
TM82	MompJ inPBS	HAL4/7	Hyperphage	1 mL <i>E. coli</i> -Lysat
TM83	MompJ in 2 M Harnstoff	HAL4/7	Hyperphage	in 10 mL PBS-T

### 3.5.6 Analyse von monoklonal, löslichen scFv-Fragmenten aus dem 2. Panning

Nach der dritten Selektionsrunde wurden insgesamt 368 Einzelkolonien für die Produktion von monoklonalen scFv-Fragmenten in Mikrotiterplatten verwendet und auf ihre Bindung an MompC bzw. MompJ untersucht.



**Abbildung 3.22: ELISAs mit scFv-Fragmenten aus der 3. Selektionsrunde des 2. Pannings**

1 µg/Kavität MompC bzw. MompJ wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Positivkontrolle ist der α-Lysozym-D1.3-scFv (TB32-2) in H9 und H12. Der Nachweis der aus 20 µL MTP-Produktionskulturüberstand gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus-α-c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege-α-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB. Zur besseren Skalierung wurde die Ordinate und damit die Messwerte der Positivkontrolle bei 2,0 bzw. 2,6 gekappt. Messwerte der Positivkontrolle lagen zwischen 2,0 und 2,3.

Für eine Vielzahl von scFv-Fragmenten wurde eine spezifische Bindung an das Zielantigen nachgewiesen (Abbildung 3.22). Aus der Selektion auf MompC konnten deutlich mehr scFv-Klone isoliert werden, als aus der Selektion auf MompJ. Nur für wenige scFv-Fragmente wurde eine spezifische Bindung an MompJ nachgewiesen (Abbildung 3.22 C und D). Die Durchführung des Pannings in PBS oder PBS mit 2 M Harnstoff hatte keinen Einfluss auf die Anreicherung von spezifisch bindenden scFv-Klonen.

### 3.5.7 Sequenzierung der isolierten scFv-Klone des 2. Pannings

Die Sequenzierungen von 66 Einzelklonen aus der dritten Runde wurden mit der Software Finch TV und der Datenbank VBASE2 (Retter et al., 2005) ausgewertet. In den 66 analysierten Sequenzen waren 6 sequenzunterschiedliche scFv-Klone vorhanden. Der scFv-Klon TM81.3-D5 war sequenzidentisch zu dem Klon TM78.1.3-G10 aus dem ersten Panning. Der scFv-Klon TM83.3-A7 war der einzige Klon, der durch die Selektion auf MompJ isoliert wurde. Die anderen scFv-Klone wurden durch die Selektion auf MompC isoliert. Die weiterverwendeten scFv-Klone und ihre Keimbahnlinien sind in Tabelle 3.9 angegeben.

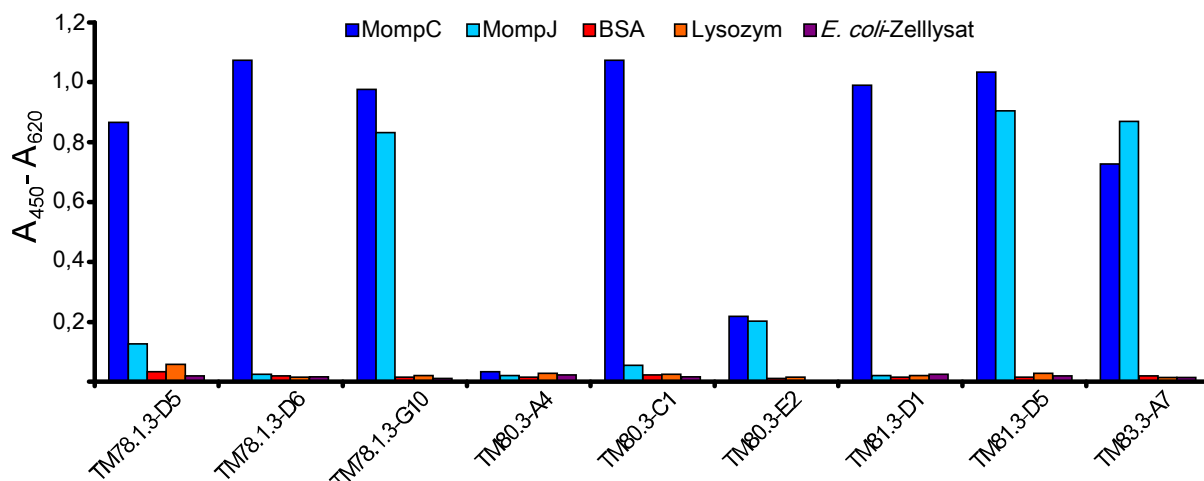
**Tabelle 3.9: Keimbahnlinien der isolierte scFv-Klone aus dem 1. und 2. Panning**

scFv-Klon	V V <sub>H</sub>	D V <sub>H</sub>	J V <sub>H</sub>	V V <sub>L</sub>	J V <sub>L</sub>
TM78.1.3-D5	IGHV3-9*01	IGHD4-23*01	IGHJ6*02	IGLV1-40*01	IGLJ2*01
TM78.1.3-D6	nicht angegeben	IGHD4-23*01	IGHJ4*02	IGLV2-11*01	IGLJ2*01
TM78.1.3-G10	IGHV5-51*01	IGHD3-9*01	IGHJ6*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
TM80.3-A4	IGHV3-30*18	IGHD3-3*02	IGHJ3*02	IGLV1-44*01	IGLJ2*01
TM80.3-C1	IGHV3-30*18	IGHD1-26*01	IGHJ4*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
TM80.3-E2	IGHV1-46*03	IGHD3-22*01	IGHJ1*01	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
TM81.3-D1	IGHV3-9*01	IGHD2-2*02	IGHJ3*02	IGLV2-14*04	IGLJ2*01
TM81.3-D5	IGHV5-51*01	IGHD3-9*01	IGHJ6*02	IGLV1-47*01	IGLJ3*02
TM83.3-A7	IGHV1-2*02	IGHD2-21*02	IGHJ3*02	IGLV3-19*01	IGLJ2*01

Die vollständigen Sequenzdaten werden aus patentrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

### 3.5.8 ELISA zur Analyse von Kreuzreaktionen mit verschiedenen Antigenen

Die neun aus dem ersten und zweiten Panning isolierten scFv-Fragmente wurden für die Produktion im Schüttelkolben in den *E. coli* Expressionsvektor pOPE101-XP kloniert und im 30 mL-SK-Maßstab produziert. Die löslich produzierten und mittels IMAC aufgereinigten scFv-Fragmente wurden in einem Kreuzreaktionstest eingesetzt.



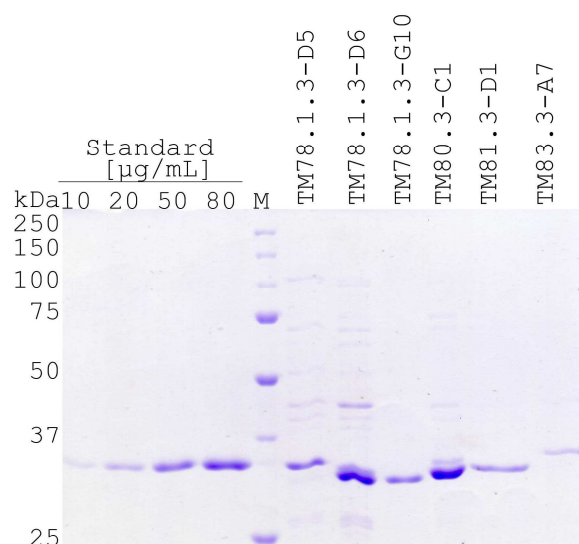
**Abbildung 3.23: ELISA zur Analyse von Kreuzreaktionen mit isolierten scFv-Fragmenten**

1 µg/Kavität MompC, MompJ, BSA, Lysozym bzw. 100 µL/Kavität des *E. coli*-Zelllysates wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Maxisorpplatte gekoppelt. Je Kavität wurden 50 µL des Ammoniumsulfat gefällten Überstandes aus der Produktion im 30 mL-Maßstab eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus-α-c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege-α-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

Mit dem Kreuzreaktionstest wurde eine spezifische Bindung der isolierten scFv-Fragmente an das entsprechende Zielantigen nachgewiesen (Abbildung 3.23). Kein scFv-Fragment band an BSA, Lysozym oder *E. coli*-Zelllysate. Die scFv-Fragmente TM80.3-A4 und TM80.3-E2 wurden nach diesem ELISA aufgrund der geringen Messsignale nicht weiterverwendet. Für das Antikörperfragment TM81.3-D5 wurden im ELISA die gleichen Bindungseigenschaften wie für das scFv-Fragment TM78.1.3-G10 nachgewiesen. Da die scFv-Klone aus zwei verschiedenen Selektionen stammten, aber sequenzidentisch waren, wurde nur der scFv-Klon TM78.1.3-G10 weiterverwendet. Die scFv-Fragmente TM78.1.3-G10 und TM83.3-A7 banden sowohl MompC als auch MompJ, obwohl keine Selektion mit wechselndem Antigen stattgefunden hat. TM83.3-A7 war der einzige scFv-Klon, der aus der Selektion auf MompJ isoliert wurde.

### 3.5.9 Produktion der isolierten scFv-Fragmente

Es erfolgte eine Produktion der scFv-Fragmente im 500 mL-Maßstab im Schüttelkolben. Es sollten Unterschiede bezüglich der Produzierbarkeit untersucht werden. Nach der Produktion wurde die periplasmatische Fraktion isoliert und die darin vorhandenen scFv-Fragmente mittels IMAC aufgereinigt (Abbildung 3.24).



**Abbildung 3.24: SDS-PAGE der Produktion der scFv-Fragmente**

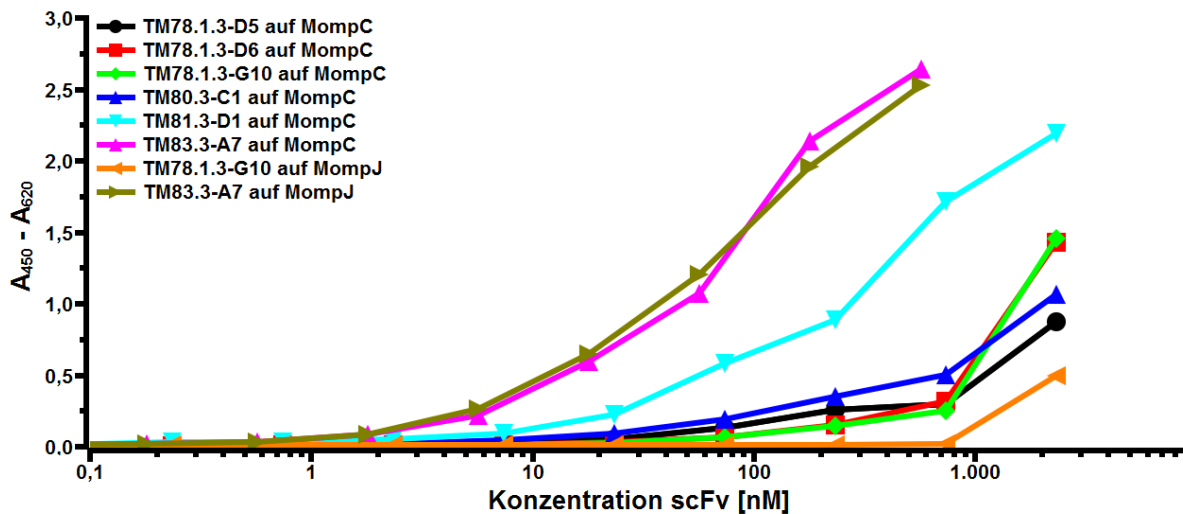
12 %iges SDS-PAA-Gel mit Coomassie gefärbt. Von den aufgereinigten Fraktionen der periplasmatischen Präparation wurden jeweils 12 µL je Probe aufgetragen. **M:** Massenstandard. **Standard:** Das in dieser Arbeit isolierte scFv-Fragment TM44-C7 in definierten Konzentrationen.

Im SDS-PAA-Gel konnten unterschiedlich intensiv gefärbte Banden für die einzelnen scFv-Fragmente nachgewiesen werden. Nach der Proteinquantifizierung mittels densitometrischer Messung ergaben die Antikörperfragmente TM78.1.3-D6 und TM80.3-C1 höhere Ausbeuten als die übrigen scFv-Fragmente. Das scFv-Fragment TM83.3-A7 ließ sich in Vergleich zu den anderen scFv-Fragmenten nur in geringen Mengen produzieren (Tabelle 3.10).

**Tabelle 3.10: Proteinausbeuten nach der IMAC**

scFv-Fragment	Proteinausbeute [µg/L Produktionsvolumen]
TM78.1.3-D5	665
TM78.1.3-D6	2271
TM78.1.3-G10	576
TM80.3-C1	2032
TM81.3-D1	207
TM83.3-A7	65

Um die Antigenbindung der scFv-Klone näher zu untersuchen, wurde ein Titrations-ELISA mit definierten scFv-Konzentrationen auf MompC und MompJ durchgeführt (Abbildung 3.25).



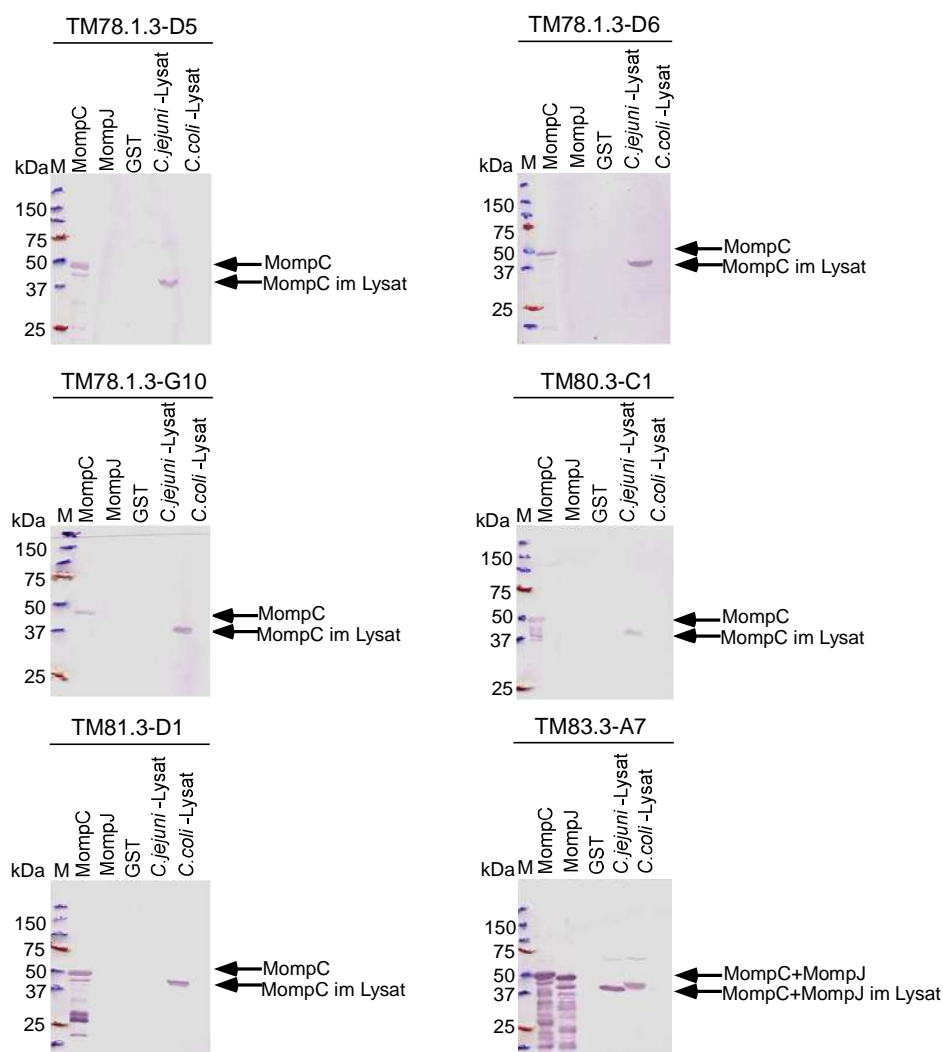
**Abbildung 3.25: ELISA mit definierten scFv-Konzentrationen**

50 ng/Kavität MompC bzw. MompJ wurden in Carbonatpuffer an eine Nunc Polysorpplatte gekoppelt. Der Nachweis der eingestzten scFv-Fragmente erfolgte über die Antikörper Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat (1:10.000). Substrat: TMB.

Es wurden deutliche Unterschiede in den Bindungseigenschaften der einzelnen Antikörperfragmente nachgewiesen (Abbildung 3.25). Für das Antikörperfragment TM83.3-A7 war die stärkste Bindung auch bei geringen Konzentrationen nachzuweisen. Das Fragment ließ sich allerdings nur in geringen Mengen produzieren. TM83.3-A7 band an beide Zielantigene, MompC und MompJ, gleichermaßen. TM78.1.3-G10 erkannte ebenfalls beide Antigene, allerdings wurden auf MompC, auf dem auch die Selektion stattfand, höhere Messwerte im ELISA erreicht. Für das Fragment TM81.3-D1 wurde ebenfalls in geringeren Konzentrationen eine Bindung an das Zielantigen nachgewiesen.

### 3.5.10 Test der Spezifität mit Immunfärbung

Die Spezifität der isolierten scFv-Fragmente sollte durch eine Immunfärbung bestätigt werden. Dazu wurde MompC, MompJ, GST, *Campylobacter jejuni*- und *Campylobacter coli*-Zelllysate mittels SDS-PAGE und Immunfärbung untersucht. Durch die Immunfärbung wurde ebenfalls nachgewiesen, ob die scFv-Fragmente lineare oder konformationelle Epitope erkennen. Falls sie konformationelle Epitope erkennen, wäre in einer Immunfärbung keine Bindung nachweisbar. Im Gegensatz zu der Selektion der OmpD-spezifischen scFv-Fragmente wurde nicht nur denaturiertes Protein für die Selektion eingesetzt. Daher bestand die Möglichkeit, dass die auf MompC und MompJ isolierten scFv-Fragmente auch konformationelle Epitope erkennen.



**Abbildung 3.26: Immunfärbung zum Test der Spezifität**

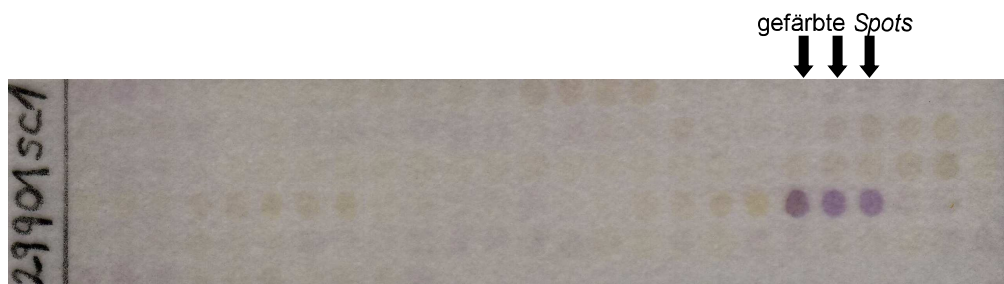
Je 1 µg je rekombinantem Protein bzw. 10 µL des Bakterienlysates wurden mittels 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und für den Western-Blot mit anschließender Immunfärbung verwendet. Je 4 µg der scFv-Fragmente wurden pro Blot eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen Antikörperfragmente erfolgte über Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Als Substrat diente NBT/BCIP (je 1:100). **M:** Massenstandard

Alle getesteten Fragmente banden an das rekombinante Protein (Abbildung 3.26). TM78.1.3-D5, -D6, -G10, TM80.3-C1 und TM81.3-D1 erkannten das Zielprotein MompC, das für die Selektion verwendet wurde. Bei der Bindung an das rekombinante Protein wurden je nach verwendetem scFv-Fragment mehrere Banden angefärbt. Dabei handelte es sich um Abbauprodukte des Zielproteins. Die Banden waren auch in einer Immunfärbung mit dem Antikörper Maus- $\alpha$ -His<sub>5</sub> nachzuweisen (siehe Anhang). Die scFv-Fragmente banden nicht unspezifisch an GST. Die Antikörperfragmente banden auch spezifisch an MompC im Ganzzelllysate von *Campylobacter coli*, nicht aber an das Ganzzelllysate von *Campylobacter jejuni*. Für das scFv-Fragment TM83.3-A7 wurde sowohl für das rekombinante als auch an das im Zelllysate befindliche Zielprotein eine Bindung nachgewiesen. Für das scFv-Fragment

TM78.1.3-G10 wurde, im Gegensatz zum ELISA (Abbildung 3.23), in der Immunfärbung nur an MompC eine Bindung festgestellt. Der Größenunterschied der rekombinanten Proteine zu den Zielproteinen im Zelllysate war auf die Konstruktion des Expressionsvektor zurückzuführen. In dem Expressionsvektor befand sich zwischen dem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag und dem Zielproteinen ein zusätzlichen *express-epitop* mit einer Länge von 26 Aminosäuren.

#### 3.5.11 Epitopkartierung

Da nachgewiesen wurde, dass die isolierten scFv-Fragmente lineare Epitope erkennen, wurde eine Epitopkartierung mittels Peptidmembranen durchgeführt. Auf den Membranen waren jeweils 15 Aminosäuren lange Peptide des MompC- und MompJ-Protein mit einem 3er Aminosäurenversatz synthetisiert (Ronald Frank, HZI Braunschweig). Die isolierten Antikörperfragmente wurden wie für eine Immunfärbung eingesetzt und die Farbreaktion auf der Membran ausgewertet.



**Abbildung 3.27: Epitopkartierung mittels Peptidmembran**

Epitopkartierung des scFv-Klons TM80.3-C1. Es wurden 4 µg des scFv-Fragments verwendet. Der Nachweis erfolgte mit Maus-α-c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege-α-Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Als Substrat wurde MTT/BCIP-Färbelösung verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die drei gefärbten Peptid-Spots.

Das Ergebnis der Epitopkartierung des scFv-Klons TM80.3-C1 ist in Abbildung 3.27 dargestellt. Die Abbildungen der Membranen der anderen fünf scFv-Fragmente befinden sich im Anhang. Anhand der gefärbten *spots* und der zugehörigen Peptidsequenz wurde das vom scFv erkannte Epitop bestimmt. Die Ergebnisse der Epitopkartierung der scFv-Klone sind in Tabelle 2.10 dargestellt.



**Tabelle 3.11: Epitope der scFv-Klone**

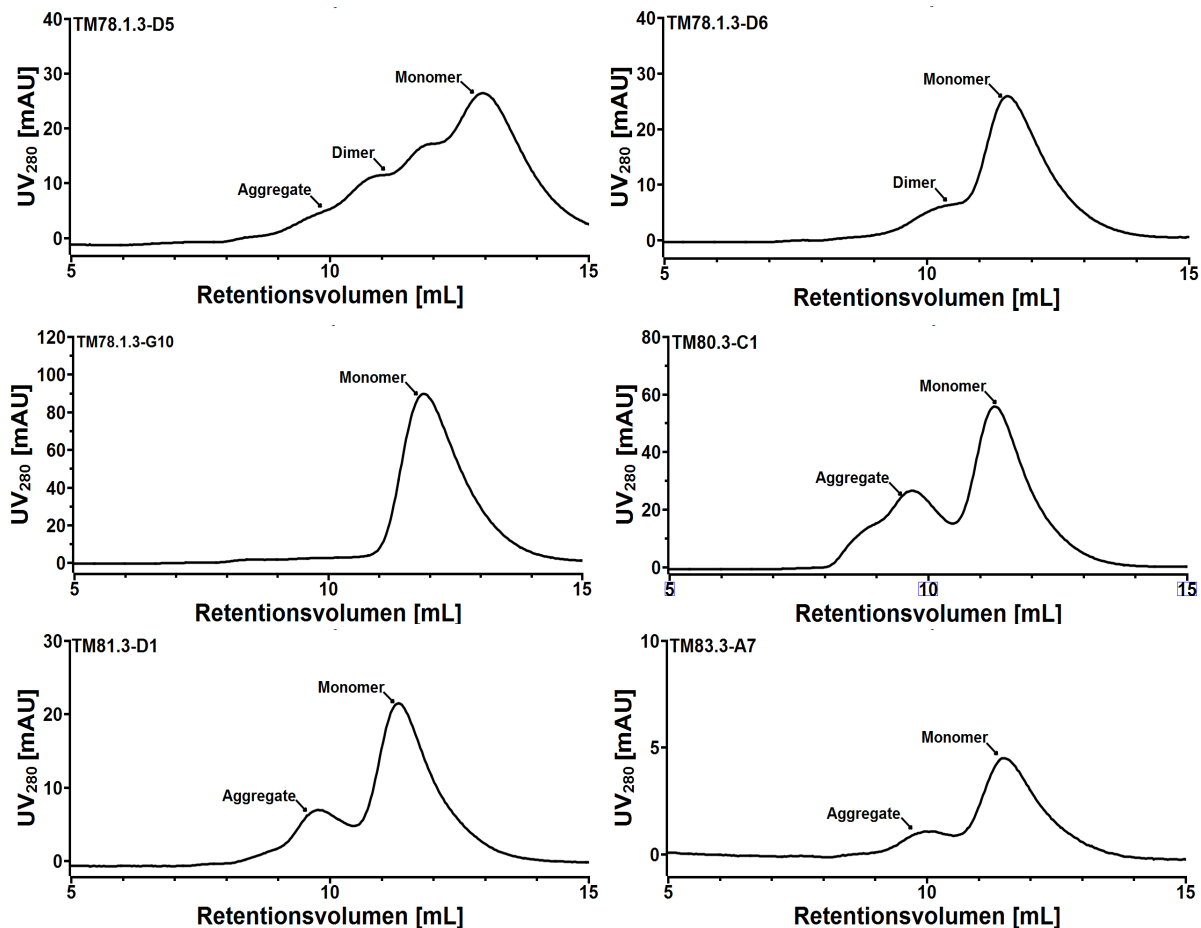
Der überlappende Bereich, der das Epitop der scFv-Klone repräsentiert wurde fett dargestellt

scFv-Fragment	spot	Epitopsequenz auf MompC	spot	Epitopsequenz auf MompJ
TM78.1.3-D5	---	nicht eindeutig	---	nicht eindeutig
TM78.1.3-D6	---	nicht eindeutig	---	nicht eindeutig
TM78.1.3-G10	46	VIL <b>GKQQLNTI</b> WTDN	43	SVI <b>AGKQQLNTI</b> WTD
	47	<b>GKQQLNTI</b> WTDNAID	44	<b>AGKQQLNTI</b> WTDNDI
TM80.3-C1	95	GWDATL <b>GGLYYGKKD</b>	100	DASL <b>GGLYYGKKDKF</b>
	96	ATL <b>GGLYYGKKDKAT</b>	101	L <b>GGLYYGKKDKFTVT</b>
	97	<b>GGLYYGKKDKATVTV</b>		
TM81.3-D1	95	GWDATL <b>GGLYYGKKD</b>	100	DASL <b>GGLYYGKKDKF</b>
	96	ATL <b>GGLYYGKKDKAT</b>	101	L <b>GGLYYGKKDKFTVT</b>
	97	<b>GGLYYGKKDKATVTV</b>		
TM83.3-A7	7	VAN <b>ATPLEEAIKDID</b>	7	AAN <b>ATPLEEAIKDID</b>
	8	<b>ATPLEEAIKDIDVSG</b>	8	<b>ATPLEEAIKDIDVSG</b>

Die Epitopkartierung konnte nicht für alle scFv-Fragmente erfolgreich durchgeführt werden. Die Epitope der Fragmente TM78.1.3-D5 und TM78.1.3-D6 wurden nicht eindeutig bestimmt, da auch nach mehrmaliger Wiederholung keine spezifische Färbung definierter *spots* nachgewiesen werden konnte. Die Antikörperfragmente TM80.3-C1 und TM81.3-D1 banden an die identischen Peptide. Bei der Epitopkartierung wurde für alle scFv-Fragmente, entgegen der Ergebnisse aus der Immunfärbung (Abbildung 3.26) und ELISA (Abbildung 3.23), eine Bindung an MompC und MompJ festgestellt. Nach der Epitopkartierung wurde anhand einer 2D-Struktur von MompC und MompJ (Zhang et al., 2000) der Bereich der Epitope im Protein bestimmt. Das Antikörperfragment TM78.1.3-G10 band in dem Bereich des 5.  $\beta$ -Faltblattes von MompC. Bei MompJ wurde dieser Bereich ebenfalls als  $\beta$ -Faltblatt definiert, jedoch liegen die letzten 6 Aminosäuren des Epitops bereits in einem Bereich, der einen externen *loop* bildet. Die scFv-Fragmente TM80.3-C1 und TM81.3-D1 erkannten ebenfalls Epitope, die im Bereich eines Übergangs vom 13.  $\beta$ -Faltblatt zu einem externen *loop* liegen. Das scFv-Fragment TM83.3-A7 band im Bereich direkt vor dem 1.  $\beta$ -Faltblatt beider Proteine.

### 3.5.12 Größenausschlusschromatographie

Um wie bei den OmpD-spezifischen scFv-Klonen einen Rückschluß auf des Aggregatverhalten der MompC- und MompJ-spezifischen scFv-Klone führen zu können, wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) mit den isolierten scFv-Fragmenten durchgeführt.



**Abbildung 3.28: Größenausschlusschromatographie der scFv-Fragmente**

Chromatogramme der SEC mit einer Superdex75 10-300GL. Als Laufpuffer wurde PBS verwendet. Es wurden je 500 µL der Probe aufgetragen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 mL/min. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm korreliert mit dem Retentionsvolumen

Das scFv-Fragment TM78.1.3-D5 bildete einen großen Anteil sowohl an Dimeren als auch an Aggregaten. TM78.1.3-D6 hingegen lag zum größten Teil als monomere Form vor und bildete nur einen geringen Anteil von Dimeren. Die Bildung von größeren Aggregaten war im Chromatogramm nicht festzustellen. Das Antikörperfragment TM78.1.3-G10 bildete weder Dimeren noch Aggregate. Die scFv-Fragmente TM80.3-C1, TM81.3-D1 und TM83.3-A7 lagen hauptsächlich in der monomeren Form vor. Bei diesen Fragmenten war im Chromatogramm allerdings auch die Bildung von Aggregaten festzustellen.

## 4 Diskussion

Antikörper übernehmen in der Diagnostik von *Salmonella* und *Campylobacter spec.* eine immer wichtigere Rolle. Sie stellen eine effektive Ergänzung zur klassischen Diagnostik mittels Selektivmedien dar. Mit immunologischen Nachweisverfahren, z. B. ELISA, lassen sich mit relativ geringem Zeit- und Personalaufwand auch große Probenzahlen zeitnah bearbeiten. Die auf dem Markt erhältlichen ELISA-Systeme verwenden meist ein Gemisch von O-Antigenen der entsprechenden Bakterienart als Festphasenantigen. Artspezifische Membranproteine, wie OmpD von *Salmonella* Typhimurium bzw. die Membranproteine MompC von *Campylobacter coli* oder MompJ von *Campylobacter jejuni* sind weitere interessante *targets* für einen immunologischen indirekten Nachweis dieser Zoonoseerreger. In dieser Arbeit wurden scFv-Fragmente aus einer naiven, humanen Antikörpergenbibliothek isoliert, die spezifisch an die Membranproteine OmpD, MompC und MompJ binden und für den indirekten Erregernachweis eingesetzt werden können.

### 4.1 Isolierung von Membranprotein-spezifischen scFv-Fragmenten

Zunächst wurde versucht OmpD-spezifische Antikörperfragmente mittels Panning auf vollständigen Zellen zu isolieren. Dazu standen die beiden Salmonellenstämme *Salmonella* Typhimurium-WT 421/425 und *Salmonella* Typhimurium  $\Delta ompD$  (Selke et al., 2007) zur Verfügung, die für ein subtraktives Panning eingesetzt wurden. Durch das subtraktive Panning bestand die Möglichkeit scFv-Fragmente zu isolieren, die das OmpD erkennen. Zou und Kollegen (2007) isolierten sieben scFv-Fragmente mittels hitzeinaktivierter Zellen von *Burkholderia pseudomallei*, während Reiche und Kollegen (2002) Ganzzelllysate von *Helicobacter pylori* zur Isolation von scFv-Fragmenten verwendeten. Die Selektion von Antikörpern und Antikörperfragmenten mittels *whole-cell*-Panning entspricht am ehesten der Bildung von Antikörpern vom Immunsystem, da die Proteine und andere antigene Strukturen des Bakteriums in ihrer nativen Form vorliegen und präsentiert werden (Watters et al., 1997). Dies erfordert stringente Selektions- und Abreicherungsbedingungen während des Pannings, um spezifische Antikörper gegen das gewünschte Zielprotein zu erhalten. Ein Nachteil des Panning auf Gram-negativen Bakterien ist die teilweise Maskierung der Membranproteine durch die LPS-Schicht. Diese Schicht hat einen störenden Einfluß auf die Bindung von Antikörpern.

pern an die Membranproteine der Zellen und ist selbst immunogen (Bentley & Klebba, 1988). Dieses Problem kann durch Ablösen der LPS-Schicht mit EDTA vor dem Panning minimiert werden (Hardaway & Buller, 1979). Nach vier Selektionsrunden wurden Einzelklone auf ihre Bindung an *Salmonella*-WT untersucht.

Von den 920 getesteten Klonen konnten nach Sequenzierung von 23 Klonen zwei sequenzunterschiedliche Klone identifiziert werden, die spezifisch an *Salmonella*-WT, aber auch an *Salmonella*  $\Delta$ ompD, banden. Somit sind diese scFv-Klone nicht spezifisch für das OmpD-Membranprotein, sondern banden entweder ein anderes Protein oder an eine LPS-Struktur der Salmonellen. Dies konnte auch mittels Western-Blot nicht eindeutig aufgeklärt werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass die zwei isolierten scFv-Klone an das rekombinant produzierte und in Harnstoff denaturiert vorliegende OmpD binden, war gering. Auf nativem Material isolierte scFv-Fragmente erkennen oftmals konformationelle Epitope, die in denaturiertem Material nicht mehr vorhanden sind. Die scFv-Fragmente TM20.6-H5 und TM20.9-C3 banden im ELISA ausschließlich an die beiden verwendeten Salmonellenstämme und nicht an die Kontrollantigene BSA oder Lysozym und auch nicht an Salmonellen-verwandte Bakterienarten wie *E. coli*, *Enterobacter cloacae* oder *Citrobacter spec.* Die Spezifität für Salmonellen der beiden isolierten scFv-Fragmente konnte somit nachgewiesen werden, müsste aber, sollten diese Klone in der Diagnostik zum Einsatz kommen, weiter verifiziert werden, indem die spezifische Bindung mit weiteren Bakterienstämmen überprüft wird. Qian und Kollegen (2008) testeten beispielsweise vier Arten von *Campylobacter* und zusätzlich *E. coli*- und *Salmonella*-Stämme. Insgesamt verwendeten sie 75 Isolate bzw. Serotypen um die Spezifität ihres monoklonalen Antikörpers zu verifizieren. Im ELISA konnte ebenfalls keine Bindung an rekombinant hergestelltes OmpD nachgewiesen werden, so dass die zwei isolierten scFv-Klone an ein anderes Salmonellen-spezifisches Protein binden.

Die Methode des subtraktiven Pannings auf vollständigen Zellen stellte sich in dieser Arbeit als nicht geeignet heraus, um scFv-Klone zu isolieren, die an das rekombinante OmpD im ELISA binden und somit in dem geplanten diagnostischen ELISA eingesetzt werden können. Im Gegensatz dazu wurden jedoch Pannings auf Zellen z. B. gegen *B. pseudomallei* (Zou et al., 2007), menschliche Spermatozon (Fischer et al., 2008) und Tumorzellen (Xu et al., 2004), (Siva et al., 2008) erfolgreich durchgeführt.

Weiterhin wurde eine Selektion von scFv-Fragmenten auf rekombinanten Proteinen durchgeführt. Dabei wurde zur Selektion von spezifischen Antikörpern gegen *Salmonella* Typhimu-

rium das OmpD und zur Isolierung von *Campylobacter*-spezifischen scFv-Fragmenten MompC und MompJ verwendet. Der Vorteil bei der Verwendung von rekombinanten Proteinen bestand darin, dass das Zielprotein wesentlich selektiver gekoppelt werden konnte und keine LPS-Strukturen das Zielprotein maskierten. Das OmpD wurde als GST-Fusionsprotein kloniert und produziert. Obwohl die Fusion von Membranproteinen mit GST zu einer erhöhten Expression führt, konnte das OmpD-Protein in *E. coli* nicht löslich produziert werden. Es musste aus *inclusion bodies* isoliert werden und war nur in 2 M Harnstoff löslich. Eine Expression als GST-Fusion führt häufiger zu der Bildung von *inclusion bodies*, insbesondere bei der Fusion eines Membranproteins (Frangioni & Neel, 1993).

Die Löslichkeit in Harnstoff führte zu dem Problem, dass eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer Glutathionmatrix nicht möglich war. Die Aufreinigung über eine Glutathionmatrix schließt einen proteolytischen Verdau mit einer Protease z. B. Faktor-Xa ein, der unter denaturierenden Bedingungen nicht durchgeführt werden kann (Harper & Speicher, 2008). Aus diesem Grund wurde das OmpD mit der GST-Domäne ohne weitere Aufreinigungsschritte für die Selektion von scFv-Klonen aus den Antikörpergenbibliotheken HAL4 und HAL7 eingesetzt.

Um trotz der gegebenen Voraussetzungen OmpD-spezifische Antikörper zu isolieren, wurden stringente Selektions- und Voranreicherungsschritte eingesetzt. Neben der Voranreicherung der Antikörpergenbibliotheken mit Milchpulver und BSA wurde zusätzlich rekombinantes GST und Ganzzelllysate des *E. coli* Top10 Stammes verwendet, der für die Produktion des GST-OmpD eingesetzt wurde. Die *Campylobacter*-Proteine MompC und MompJ wurden ebenfalls rekombinant in *E. coli* produziert. Hierbei wurde jedoch auf die Fusion mit GST verzichtet und eine Aufreinigung über einen N-terminalen His<sub>6</sub>-tag durchgeführt. Diese Aufreinigung konnte auch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Im Gegensatz zu OmpD von *Salmonella* Typhimurium konnten die *Campylobacter*-Proteine MompC und MompJ in höherer Reinheit rekombinant hergestellt und für die Antikörperselektion eingesetzt werden, aber auch bei dieser Panningstrategie wurde neben BSA und Milchpulver mit *E. coli*-Ganzzelllysate eine Voranreicherung von unspezifischen Antikörperphagen durchgeführt. Im Gegensatz zu der Selektion auf ganzen Zellen, die „in Lösung“ durchgeführt wurde, fand die Selektion auf rekombinantem Material immobilisiert in Mikrotiterplatten statt. Es ist bekannt, dass die Immobilisierung von Proteinen an einer Mikrotiterplatte zu einer partiellen Denaturierung des Proteins führen kann (Lundquist et al., 2006) und somit scFv-Fragmente

isoliert werden können, die denaturiertes Antigen erkennen, nicht aber an das native Protein binden. Da die eingesetzten Antigene bereits in Harnstoff denaturiert vorlagen, wurde dieser Aspekt vernachlässigt.

Für die Antigenbindung erwiesen sich die Polysorpplatten (Nunc, Dänemark) als geeigneter als die Maxisorpplatten (Nunc, Dänemark). Die Polysorpplatten sind für die Kopplung von hydrophoben Proteinen ausgelegt und besitzen eine dreimal geringere Protein-Bindungskapazität verglichen mit den Maxisorpplatten, wodurch die Kopplung von unspezifischen Proteinen minimiert werden kann. Dadurch wird eine Verringerung von falsch positiven ELISA-Signalen erreicht. Eine Problematik bei der Isolation von scFv-Fragmenten mit Festphasen gekoppeltem Antigen, ist die mögliche Anreicherung von scFv-Dimeren, da auf der Platte Bereiche hoher Antigendichte entstehen können und somit bei der Bindung der scFv-Fragmente Aviditätseffekte auftreten können (Schier & Marks, 1996).

Nach der dritten und vierten Selektionsrunde wurden bei der Isolation von OmpD-spezifischen Antikörperfragmenten insgesamt 736 Einzelklone auf ihre Bindungseigenschaften untersucht. Die ELISA-Signale der monoklonalen scFv-Fragmente der Klone, die aus der HAL7-Bibliothek isoliert wurden, waren im ELISA deutlich höher als die ELISA-Signale der HAL4-Klone. Die aus der HAL7-Bibliothek isolierten scFv-Fragmente hatten eine höhere Spezifität als die scFv-Fragmente aus der HAL4-Bibliothek und zeigten nur in wenigen Fällen Kreuz- oder unspezifische Reaktionen auf den Testantigenen GST, BSA oder *E. coli*-Zelllysate. Nach der Sequenzierung von 78 Einzelklonen aus der dritten und vierten Runde sowohl aus der HAL4- als auch aus der HAL7-Bibliothek wurden insgesamt sieben sequenzverschiedene Klone bestimmt. Alle isolierten Klone stammten aus der HAL7-Bibliothek und beinhalten eine leichte Kette ( $V_L$ ) der  $\lambda$ -Klasse. Der scFv-Klon TM43-G2 wurde insgesamt 29 mal isoliert, die Sequenz des TM44-C7 hingegen nur einmal. Die Häufigkeit, mit der scFv-Fragmente aus einer Bibliothek isoliert werden, wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Eine gute Produzierbarkeit und geringe Toxizität sorgt für eine hohe Anreicherung des scFv-Fragments in den Selektionsrunden. Ein weiterer Faktor ist die Affinität des scFv-Fragmentes zu dem Zielantigen. Je affiner der Antikörper, desto höher die Wahrscheinlichkeit ihn während des Pannings zu isolieren. Diese Umstände sind bei der Wahl der Waschzyklen und der Elutionsmethode zu berücksichtigen. Das aus der HAL4-Bibliothek keine Klone isoliert wurden ist nicht zu erklären, da die Pannings parallel durchgeführt wur-

den und das natürliche Vorkommen von  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Antikörpern 60 % zu 40 % beträgt (Abbas et al., 2007).

Bei der Isolation von *Campylobacter*-spezifischen scFv-Klonen auf MompC und MompJ wurden die verwendeten Antikörpergenbibliotheken HAL4 und HAL7 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt eingesetzt. Bei der ersten Selektion wurden die beiden Zielantigene MompC und MompJ denaturiert in Harnstoff eingesetzt. Aus dieser Selektion konnten nach der Sequenzierung die drei sequenzverschiedenen Klone TM78.1.3-D5, TM78.1.3-D6 und TM78.1.3-G10 isoliert werden. Die zweite Selektion wurde sowohl auf denaturiertem Material in Harnstoff als auch auf Antigen, das gegen PBS ohne Harnstoff dialysiert wurde, durchgeführt. Aus dieser Selektion konnten die sechs sequenzverschiedenen Klone TM80.3-A4, TM80.3-C1, TM80.3-E2, TM81.3-D1, TM81.3-D5 und TM83.3-A7 isoliert werden. Trotz unterschiedlicher Strategien wurden die zwei sequenzidentische Klone TM78.1.3-G10 und TM81.3-D5 isoliert. Beim Vergleich der Selektion von OmpD-spezifischen scFv-Fragmenten mit der Selektion von MompC- bzw. MompJ-spezifischen scFv-Fragmenten fällt auf, dass auch bei der Selektion auf MompC und MompJ nur scFv-Fragmente isoliert wurden, die eine leichte Kette ( $V_L$ ) der  $\lambda$ -Klasse besitzen und somit aus der HAL7-Antikörpergenbibliothek isoliert wurden. Gegen MompC wurden deutlich mehr unterschiedliche Binder isoliert als gegen MompJ. Bei der ersten Selektion wurden gegen MompJ keine Binder isoliert. Bei der zweiten Selektion konnte nur der Klon TM83.3-A7 auf MompJ isoliert werden. Dieses Ergebnis ist insofern unerwartet als das beide Antigene eine hohe Homologie zueinander aufweisen und damit eine ähnliche Zahl an Bindern in den Pannings hätte isoliert werden sollen. Die Homologie wurde anhand von Peptidmustern nach Proteaseverdau (Page et al., 1989) und dem Sequenzvergleich auf Aminosäureebene von *C. coli* und 22 *C. jejuni*-Stämmen (Zhang et al., 2000) (Bolla et al., 2004) bestimmt. Auch der Vergleich der Aminosäurezusammensetzung mit den Membranproteinen OmpC und OmpF von *E. coli* ergab sehr ähnliche Ergebnisse (Bolla et al., 1995). Da nur wenige unspezifisch bindende scFv-Fragmente in dieser Selektion angereichert wurden, kann von einer erfolgreichen Abreicherung unspezifischer Binder mit BSA, Milchpulver, Lysozym und dem *E. coli*-Ganzzelllysat des Produktionsstammes ausgegangen werden.

Nach der Sequenzierung der scFv-Klone wurden diese im Schüttelkolben produziert und erneut auf ihre Antigenbindung und Spezifität im ELISA hin untersucht. Für die sieben OmpD-spezifischen scFv-Klone konnten keine Kreuzreaktionen oder unspezifische Bindung

auf den anderen getesteten Antigenen nachgewiesen werden. Anhand einer Analyse der Produktionsüberstände und der periplasmatischen Fraktion mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung wurden die Produktionsausbeuten der einzelnen scFv-Fragmente miteinander verglichen. Die fünf scFv-Klone TM43-E2, TM43-C5, TM43-G2, TM43-E10 und TM43-F8 ließen sich alle mit ähnlichen Proteinausbeuten von 0,2 bis 0,5 mg scFv/L Kulturvolumen produzieren. Der scFv-Klon TM44-C8 konnte nur in geringeren Mengen von 0,04 mg scFv/L Kulturvolumen produziert werden. Der scFv-Klon TM44-C7 wies von allen scFv-Klonen die besten Produktionseigenschaften auf und erlaubte Proteinausbeuten von > 5,8 mg scFv/L Kulturvolumen im Schüttelkolben. Durch weitere Optimierungen der Produktionsbedingungen sind jedoch noch weitaus höhere Proteinausbeuten zu erwarten. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, dass nicht alle produzierten scFv-Fragmente korrekt gefaltet werden und somit nicht funktionell sind (Kipriyanov et al., 1997). Die sekretorische Expression eines  $\alpha$ -phOx-scFv-Fragments konnte von 3,0 mg/L durch den Zusatz von 0,4 M Saccharose auf 16,5 mg/L im Medium erhöht werden (Kipriyanov et al., 1997). Das gleiche scFv-Fragment konnte in einer Hochzelllichtfermentation mit 1,2 g/L produziert werden (Sletta et al., 2004). Die optimalen Expressionsbedingungen in *E. coli* müssen für jedes scFv-Fragment neu bestimmt werden.

Die auf MompC- und MompJ isolierten scFv-Fragmente wurden ebenfalls nach einer Produktion im Schüttelkolben auf Kreuzreaktion im ELISA mit anderen Antigenen getestet. Dabei wurde bei dieser Analyse auch die Kreuzreaktion der isolierten Klone auf MompC bzw. MompJ getestet. Im ELISA konnte keine unspezifische Bindung mit den Kontrollantigenen nachgewiesen werden. Für die Klone TM78.1.3-G10 und TM83.3-A7 wurde jedoch eine Kreuzreaktion auf MompC bzw. MompJ festgestellt. TM78.1.3-G10 stammt aus der Selektion auf MompC und bindet im ELISA ebenfalls an MompJ. TM83.3-A7 war der einzige scFv-Klon der aus der Selektion auf MompJ isoliert worden war. Die Klone TM80.3-A4 und TM80.3-E2 wurden nach diesen Untersuchungen nicht weiterverwendet, da eine zu schwache Antigenbindung im ELISA festgestellt worden war, um später in einem diagnostischen ELISA eingesetzt werden zu können. Bei dem Vergleich der Proteinausbeuten waren wieder deutliche Unterschiede zu sehen. Die scFv-Klone TM8.1.3-D5, TM78.1.3-G10 und TM81.3-D1 ließen sich mit Ausbeuten von 0,2 bis 0,7 mg/L Kulturvolumen produzieren, während die Klone TM78.1.3-D6 und TM80.3-C1 sich mit über 2 mg scFv/L produzieren ließen. Der Klon



TM83.3-A7 wurden mit nur 0,07 mg scFv/L Kulturvolumen von allen scFv-Klonen am schlechtesten produziert.

Da die ersten Selektions-ELISAs mit Produktionsüberständen bzw. aufgereinigtem Material durchgeführt wurden ohne die Konzentration zu berücksichtigen, war das ELISA-Signal von zwei Faktoren abhängig. Die Affinität des scFv-Fragmentes zum Antigen und der Expression des scFv-Fragmentes in *E. coli*. Beim Screening mittels ELISA mit definierten Konzentrationen wurde der Einfluss der „Produzierbarkeit“ ausgeschlossen und den ELISA-Signalen liegen lediglich die Affinität und gegebenenfalls die Avidität der eingesetzten scFv-Fragmente zu Grunde. Die scFv-Klone, die sich sehr gut produzieren lassen, wie TM44-C7 oder TM78.1.3-D6, ergaben nur aufgrund der hohen Konzentration ein hohes ELISA-Signal. Sowohl bei den OmpD- als auch bei den MompC- bzw. MompJ-spezifischen scFv-Fragmenten konnten deutliche Unterschiede in der relativen Affinität festgestellt werden. Für die scFv-Klone TM44-C8, TM43-G2, TM43-C5 und TM44-C7 konnte nur eine geringe Affinität zu dem Zielantigen festgestellt werden und mussten in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Die scFv-Klone TM43-F8 und TM43-E10 hatten eine hohe Affinität und ergaben bereits bei sehr geringen Konzentrationen ELISA-Signale  $A_{450}-A_{620} \geq 1,0$ . Die geringe Affinität des TM44-C7 wurde anhand einer Oberflächenplasmonresonanzmessung auf dem entsprechenden Epitop-präsentierenden Peptid bestätigt. Dieses Peptid lag bereits synthetisiert vor, da es sich um ein Peptid handelt, das bereits in einer vorangegangenen Arbeit (Selke et al., 2007) als immunogener Bestandteil von OmpD identifiziert worden war. In der Messung wurde eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $1,22 \times 10^{-7}$  M bestimmt. Vergleicht man die Affinität von TM44-C7 mit den gemessenen Affinitäten anderer scFv-Fragmente, so wird deutlich, dass TM44-C7 eher zu den niederaffinen Bindern gezählt werden muß. Huang und Kollegen (2006) isolierten mittels Phagendisplay einen  $\alpha$ -Laminin-1-scFv mit einer  $K_D$  von  $9,9 \times 10^{-8}$  M und Schier und Kollegen isolierten einen  $\alpha$ -c-erbB-2-scFv mit einer  $K_D$  von  $1,6 \times 10^{-8}$  M. Es sind allerdings auch scFv-Fragmente mit einer ähnlichen Affinität wie der TM44-C7 beschrieben. Müller-Loennies und Kollegen (2000) erhielten eine  $K_D$  von  $2,2 \times 10^{-7}$  M für einen  $\alpha$ -LPS-scFv. Durch Zufallsmutagenese und anschließende Selektion der mutierten scFv-Fragmente ist die Isolierung von scFv-Fragmenten mit  $K_D$ -Werten im subnanomolaren Bereich möglich. In der eigenen Arbeitsgruppe konnten affinitätsgeriffte  $\alpha$ -MUC1-scFv-Fragmente mit einer  $K_D$  von  $5,7 \times 10^{-10}$  M erzeugt werden, was einer 400 fachen Affinitätsteigerung entsprach (persönliche Mitteilung H. Thie, AG Dübel).

Für die MompC- und MompJ-spezifischen scFv-Fragmente ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie für die OmpD-spezifischen scFv-Fragmente. Die höchste Affinität konnte für den Klon TM83.3-A7 nachgewiesen werden. Für ihn konnte schon in den vorangegangenen Analysen eine Bindung an MompC nachgewiesen werden und im konzentrationsabhängigen ELISA sind nahezu identische Messergebnisse auf MompC und MompJ festzustellen. Bei dem Klon TM78.1.3-G10, der ebenfalls im ELISA an beide Antigene bindet, konnte hingegen ein konzentrationsabhängiger Unterschied in den Messergebnissen auf den beiden Antigen nachgewiesen werden, wobei die Bindung an MompJ generell schwächer ausfiel. Neben dem scFv-Klon TM83.3-A7 konnte nur noch für den Klon TM81.3-D1 eine im Vergleich zu den anderen scFv-Klonen gute Affinität zum Zielantigen nachgewiesen werden. Um exakte Aussagen über die Affinitäten machen zu können, müsste für alle isolierten scFv-Klone eine Oberflächenplasmonresonanzmessung auf den entsprechenden Peptiden durchgeführt werden. Dieses lohnt sich allerdings aufgrund der zeit- und kostenintensiven Synthese von Peptiden nur für Antikörper, die sich in den anderen Versuchen für den Einsatz im diagnostischen ELISA als potentiell geeignet herausgestellt haben. Eine Messung auf den vollständigen Proteinen war nicht möglich, da die Kopplung der Antigene an die Oberfläche des Messchips unter denaturierenden Bedingungen nicht möglich war. Auch die Kopplung der Antigenfraktionen MompC und MompJ, die nur in PBS gelöst waren, blieb erfolglos. Möglicherweise waren trotz Dialyse noch sehr geringe Mengen von Harnstoff vorhanden, die sich aufgrund der Aminogruppen des Harnstoffs störend auf die Kopplungsreaktion auswirkten.

Anhand der durchgeführten ELISAs konnte gezeigt werden, dass bei der Isolation von Antikörperfragmenten aus Antikörpergenbibliotheken mehrere Faktoren eine Rolle spielen. TM44-C7 hat nur eine geringe Affinität, die bei der Selektion aus der HAL7 Antikörpergenbibliothek aber durch die sehr gute Produzierbarkeit kompensiert wurde. Der scFv-Klon TM83.3-A7 kann im Vergleich zu den anderen scFv-Klonen nur mit geringen Proteinausbeuten produziert werden. Diese geringe Expressionsrate wird allerdings durch die bessere Affinität zu MompJ im ELISA ausgeglichen. Im Selektionsprozess von Antikörperfragmenten sollte in einem möglichst frühen Stadium eine konzentrationsabhängige Analyse im ELISA durchgeführt werden, um die beschriebenen Aspekte zu untersuchen und somit potentiell geeignete scFv-Klone zu bestimmen bzw. ungeeignete Klone zu eliminieren.

Nach den Analysen mittels ELISA wurden zur weiteren Charakterisierung der scFv-Klone die Bindungseigenschaften mittels Immunfärbung untersucht. Da die Selektion auf denaturiertem

Material durchgeführt wurde, war es wahrscheinlich scFv-Fragmente zu isolieren, die lineare Epitope erkennen. Bei der Immunfärbung wurde sowohl die Bindung an den rekombinant produzierten Zielantigenen OmpD, MompC und MompJ als auch an GST und den Ganzzelllysaten von *C. coli*, *C. jejuni*, *S. Typhimurium*-WT, *S. Typhimurium*  $\Delta ompD$  und *E. coli* Top10 untersucht. Für alle OmpD-spezifischen scFv-Klone konnte eine Bindung an das rekombinante OmpD und an eine Proteinbande im Ganzzelllysate von *S. Typhimurium*-WT nicht aber im Lysat von *S. Typhimurium*  $\Delta ompD$ , die der Laufhöhe des OmpD entspricht, nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktion mit GST oder *E. coli*-Lysat konnte wie im ELISA nicht festgestellt werden. Für das scFv-Fragment TM43-F8 konnte eine Kreuzreaktion mit zwei weiteren Proteinen von *S. Typhimurium*-WT und *S. Typhimurium*  $\Delta ompD$  festgestellt werden. Da die Proteinbanden bei beiden Stämmen angefärbt wurden, muß es sich hierbei um andere Proteine als OmpD handeln.

Für die *Campylobacter*-spezifischen scFv-Klone konnte ebenfalls eine Bindung an das rekombinante und das entsprechende Zielprotein im Ganzzelllysate nachgewiesen werden. Bis auf das scFv-Fragment TM83.3-A7 banden alle scFv-Fragmente nur an MompC. Das scFv-Fragment TM78.1.3-G10 band nur in hohen Konzentrationen im ELISA an MompJ, obwohl bis auf zwei Aminosäuren das gleiche Epitop erkannt wird. Im Western-Blot war keine Kreuzreaktion festzustellen. Da es sich bei den erkannten Epitopen des scFv-Fragments um lineare Bereiche handelt, sollten konformationelle Unterschiede im Protein ausgeschlossen werden können. Das scFv-Fragment TM83.3-A7 band wie im ELISA sowohl an MompC als auch an MompJ. Alle isolierten scFv-Klone erkennen lineare Epitope und können somit im ELISA auf denaturiertem Material und im Western-Blot eingesetzt werden. Da sie auch im Ganzzelllysate spezifisch nur an MompC bzw. MompC und MompJ binden und keine Bindung mit anderen *Campylobacter*proteinen oder *E. coli*-Lysat eingehen, sind sie auch für einen Erregernachweis mittels Western- oder Dot-Blot geeignet. Hierfür müssen allerdings die Nachweisgrenzen und die Bedingungen einer eventuellen Voranreicherung bestimmt werden. Quian und Kollegen (2008) veröffentlichten Ergebnisse, in denen sie einen monoklonalen IgG auf die Eignung zur spezifischen Diagnostik von *C. jejuni* testeten. Dieser IgG hatte eine Nachweisgrenze von  $1,7 \times 10^3$  Zellen pro spot.

Da die isolierten scFv-Fragmente lineare Epitope erkennen, konnte eine Bestimmung mittels Epitopkartierung auf Membranen durchgeführt werden. Bei der Epitopkartierung wurden die scFv-Fragmente auf Membranen inkubiert, an die 15 Aminosäuren lange Peptide mit der

Aminosäurenabfolge von OmpD, MompC bzw. MompJ immobilisiert wurden. Durch einen Sequenzversatz von je drei Aminosäuren konnte auf das Epitop rückgeschlossen werden. Für die fünf OmpD-spezifischen Fragmente konnte ein Epitop bestimmt werden. Für das scFv-Fragment TM43-E10 wurde eine schwache Kreuzreaktion mit einem zweiten Epitop auf OmpD festgestellt. Für die auf MompC und MompJ isolierten scFv-Fragmente konnte nicht für alle der Epitopbereich bestimmt werden. Für die Klone TM78.1.3-D5 und TM78.1.3-D6 war eine Bestimmung des Epitops nicht möglich, da kein definierter Bereich auf der Membran gefärbt wurde. Für das scFv-Fragment TM83.3-A7 konnte ein zwölf Aminosäuren langer Bereich als potentielles Epitop eingegrenzt werden. Wie die vorangegangenen Versuche mittels ELISA und Immunfärbung vermuten ließen, war diese Aminosäuresequenz sowohl in MompC als auch in MompJ zu finden. Bei der Epitopkartierung von TM80.3-C1 und TM81.3-D1 konnte eine Sequenz von neun Aminosäuren als Epitopbereich bestimmt werden. Beide scFv-Klone erkennen das gleiche Epitop, obwohl sie selbst unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen. Das erkannte Epitop dieser beiden scFv-Fragmente war auch in MompJ vorhanden, jedoch wurde keine Kreuzreaktion der scFv-Fragmente auf MompJ im ELISA oder der Immunfärbung nachgewiesen. Um eine genauere Aussage über die an der Bindung beteiligten Aminosäuren treffen zu können, müsste der als Epitop bestimmte Bereich auf einer neuen Membran mit einer Aminosäureversatz synthetisiert und getestet werden (Frank, 1992).

Anhand eines 3D-Homologiemodells für OmpD bzw. einer 2D-Strukturanalyse von MompC und MompJ (Zhang et al., 2000) wurden die Epitope den Strukturbereichen im nativen Protein zugeordnet. Membranproteine sind hauptsächlich aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, die durch kurze *loops* miteinander verbunden sind. Diese Struktur ermöglicht es ihnen den Transport von niedermolekularen Substanzen durch die Membran zu gewährleisten. Antikörperfragmente, die externe *loops* von Membranproteinen erkennen, sollten am ehesten in der Lage sein eine Kompetition im ELISA mit Serumantikörpern zu bewirken. Die externen *loops* sind neben der LPS-Schicht die Strukturen, die bei der Infektion mit Bakterien vom Immunsystem als erstes als fremdartig erkannt werden und zur Generierung von Antikörpern führen (Singh et al., 2000). Für die scFv-Fragmente konnte kein bevorzugtes Epitop festgestellt werden. Die scFv-Fragmente binden an Bereiche von  $\beta$ -Faltblättern und an die Übergangsbereiche von  $\beta$ -Faltblättern zu den *loops*. Es wurden keine Antikörperfragmente isoliert, die nur im Bereich

eines *loops* binden. TM43-E10 war das scFv-Fragment, dessen Epitop zum größten Teil im Bereich eines *loops* lag.

Bei der Etablierung von Testsystemen in der Diagnostik muß auch ein besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, wie gut bzw. wie lange das System gelagert und verwendet werden kann. Ein großes Problem von scFv-Fragmenten ist die Neigung zur Bildung von Dimeren oder größeren Aggregaten. Je länger die scFv-Fragmente gelagert werden, desto wahrscheinlicher ist es, dass es zur Bildung größerer Aggregate kommen kann (Breitling & Dübel, 1997). Derartige scFv-Fragmente sind für den diagnostischen Einsatz unbrauchbar. Anhand einer Größenausschlusschromatographie wurden die isolierten scFv-Fragmente auf ihr Aggregationsverhalten hin untersucht. Die scFv-Fragmente TM44-C7, TM43-E10, TM43-F8 und TM78.1.3-G10 lagen hauptsächlich in der monomeren Form vor. Nur ein sehr geringer Anteil lag als größere Aggregate vor. Diese scFv-Fragmente wären aufgrund ihrer geringen Aggregationsneigung auch für eine längere Lagerung und dem Einsatz im Testsystem geeignet. Die scFv-Fragmente TM43-G2 und TM78.1.3-D5 lagen zum großen Teil als Dimere bzw. als größere Aggregate vor und bieten somit keine guten Voraussetzungen um in einem auch länger lagerfähigen Testsystem eingesetzt zu werden.

Bestandteil dieser Arbeit war die Parameterbestimmung für einen kompetitiven ELISA. Kompetitive ELISA wurden z. B. bereits zur Diagnostik von *Schistosoma japonicum* (Mitchell et al., 1983), *Trypanosoma cruzi* (Tachibana et al., 1988) und *Babesia bigemina* (Goff et al., 2008) beschrieben. Allen gemeinsam ist die Verwendung von IgG-Antikörpern als Kompetitor. Da der Nachweis über die eingesetzten Kompetitoren erfolgt, hat dies den Vorteil, dass dieses Testsystem tierartübergreifend eingesetzt werden kann, ohne das Nachweissystem ändern zu müssen. Der kompetitive ELISA ist prinzipiell so aufgebaut, dass die eingesetzten Antikörper mit den Antikörpern des zu testenden Serums um die freien Bindungsstellen am Antigen konkurrieren und dadurch auch die Spezifität des Testsystems erhöht werden kann (Maddison, 1991). Da der Nachweis des Kompetitor erfolgt, findet im ELISA eine Abschwächung des Messsignals statt, wenn sich im Testserum Antikörper gegen das gekoppelte Zielantigen befinden. Ein ELISA zur Diagnostik von Salmonellen bzw. *Campylobacter* mit einem rekombinanten scFv-Fragment als Kompetitor wurde bisher nicht beschrieben und sollte in dieser Arbeit etabliert werden.

Für die Etablierung wurden verschiedene Parameter untersucht werden. Anhand von Titrations-ELISAs wurde die einzusetzende Menge an Antigen und scFv-Fragment und die Verdün-

nung des Testserums bestimmt (Daten nicht gezeigt). Eine Antigenmenge von 100 ng pro Kavität und eine Serumverdünnung von 1:4 erwies sich als geeignet, um im ELISA Meßsignale von  $A_{450}-A_{620} \approx 1,0$  im linearen Bereich zu erhalten. Zum Erreichen dieses Wertes mussten die verschiedenen scFv-Fragmente in Konzentrationen von 1 bis 5 µg/mL eingesetzt werden. In der Diagnostik übliche Verdünnungen der Tierseren liegen bei 1:200 oder höher (pers. Mitteilung J. Stratmann-Selke, IVD GmbH) aber auch unverdünnte Seren kommen teilweise zum Einsatz (Goff et al., 2008). Ein weiterer zu testender Parameter war die Inkubationsreihenfolge der einzelnen Lösungen. Ein kompetitiver Effekt war nur dann zu verzeichnen, wenn das zu testende Serum vor dem verwendeten scFv-Fragment inkubiert wurde. Bei gleichzeitiger Inkubation oder einer Inkubation des scFv-Fragments auf dem Antigen vor dem Serum konnte kein kompetitiver Effekt festgestellt werden. Zu erklären wäre dieses dadurch, dass die scFv-Fragmente eine höhere Affinität als die Antikörper in den Tierseren haben und sie deshalb nicht mehr verdrängt werden können. IgGs besitzen gegenüber scFv-Fragmenten aufgrund ihrer zwei Bindungsarme einen Aviditätseffekt, der zu einer höheren apparenten Affinität führen kann. Dieser Effekt wirkt sich allerdings nur bei einer hohen Antigendichte auf der ELISA-Platte aus. Die Antikörper im Serum wurden im Gegensatz zu den scFv-Fragmenten nicht auf denaturiertem sondern auf nativem Antigen durch die Infektion von Schweinen mit Salmonellen generiert. Dies könnte wiederum ein Affinitätsvorteil für die scFv-Fragmente sein, da sie auf dem Antigen in denaturierter Form selektioniert wurden. Bei der Selektion auf denaturiertem Protein stehen den scFv-Fragmenten wesentlich mehr und andere Bereiche des Membranproteins zur Bindung zur Verfügung als dem Immunsystem, das zum großen Teil die ganzen Bakterienzellen präsentiert bekommt. Dabei können nur Antikörper binden, die die externen *loops* der Membranproteine erkennen.

Nach Festlegung der Inkubationsreihenfolge wurden die einzelnen isolierten scFv-Fragmente auf ihre Eignung zum Einsatz im kompetitiven ELISA untersucht. Die größte Kompetition wurde mit dem scFv-Fragment TM43-E10 erreicht. Hier konnte bei der Verwendung des positiven Testserums eine Verringerung des ELISA-Signals in Bezug auf die Maximalwertkontrolle von 65 % festgestellt werden. Das scFv-Fragment TM43-F8 zeigte den gleichen Effekt, allerdings fand hierbei keine Diskriminierung zwischen dem positiven Testserum und dem negativen Ferkelserum statt. Für die scFv-Fragmente TM44-C7, TM43-E2 und TM43-G2 konnte kein oder nur geringer kompetitiver Effekt festgestellt werden. Die scFv-Fragmente TM43-E10 und TM43-F8 waren die Antikörperfragmente deren Epitope im Über-

gangsbereich eines  $\beta$ -Faltblattes zu einem externen *loop* lagen und in der Lage sein sollten mit den potentiellen Serumantikörpern um die Bindungsstellen zu konkurrieren. Dass nicht alle scFv-Fragmente den gleichen kompetitiven Effekt aufweisen, bestätigt die Spezifität der Reaktion und unspezifische Einflüsse z. B. der Pufferbestandteile können ausgeschlossen werden. Die scFv-Klone TM43-E10 und TM43-F8 sind somit am besten geeignet einen kompetitiven ELISA zur Diagnostik zu etablieren.

Trotz der Isolierung von zwei geeigneten scFv-Fragmenten, wurde zur Erweiterung des zur Verfügung stehenden Antikörperrepertoires eine Mutagenisierung der isolierten scFv-Fragmente durchgeführt. Die Mutagenisierung wurde mittels *error-prone*-PCR durchgeführt, da diese Methode hohe Mutationsraten in dem entsprechenden Gen verursacht und somit die Wahrscheinlichkeit erhöht nach der Selektion scFv-Fragmente mit verbessert Bindungs- und Produktionseigenschaften zu erhalten. Die Erhöhung der Affinität der scFv-Fragmente hätte den Vorteil, dass im diagnostischen ELISA eine geringere Antigen- und scFv-Fragmentmenge eingesetzt werden könnte und somit der Test-ELISA kostengünstiger angeboten und sensitiver gemacht werden könnte. Die Affinität dürfte aber nicht so weit gesteigert werden, dass die scFv-Fragmente von den Serumantikörpern nicht mehr verdrängt werden können. Eine Erhöhung der Produktionsrate der Antikörperfragmente hätte den gleichen Vorteil und durch die größeren Chargen müssten seltener Chargenkontrolle stattfinden. Für die Erzeugung der mutagenisierten Antikörpergenbibliothek wurden die  $\alpha$ -OmpD-scFv-Fragmente TM43-E2, TM43-G2, TM44-C7, TM44-C8, TM43-E10 und TM43-F8 verwendet. Da andere Arbeiten (Schier et al., 1996) (Zahnd et al., 2004) (Daugherty et al., 2000) (Groves et al., 2006) und (Thie, 2008) gezeigt haben, dass durch die Mutagenisierung Antikörperfragmente mit völlig veränderten Bindungseigenschaften erzeugt werden können, wurden nicht nur die zwei favorisierten scFv-Fragmente TM43-E10 und TM43-F8 verwendet. Um eine möglichst komplexe Bibliothek zu erhalten, wurden die sechs verwendeten Antikörperfragmente in getrennten Ansätzen mutagenisiert. Da bereits OmpD-spezifische Antikörperfragmente eingesetzt wurden und aufgrund der hohen Anzahl an Klonen, die ein *insert* der vollen Länge beinhalten, bestand die Möglichkeit, OmpD-spezifische Antikörperfragmente mit verbesserten Eigenschaften für den kompetitiven ELISA zu isolieren.

### 4.2 Ausblick

In weiteren Arbeiten müssen zu Etablierung eines kompetitiven, diagnostischen ELISAs die isolierten und favorisierten OmpD-spezifischen scFv-Fragmente TM43-E10 und TM43-F8 mit weiteren Testseren und schließlich im Feldversuch auf ihre Eignung zur Salmonellen-diagnostik hin untersucht werden und eventuell weitere geeignete scFv-Klone aus den mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken isoliert und charakterisiert werden. Weiterhin muss die Spezifität und Sensitivität des kompetitiven ELISAs mit den bereits kommerziell erhältlichen Testsystemen verglichen werden. Die Produktion von TM43-E10 und TM43-F8 sollte aus dem Schüttelkolbenmaßstab auf die Produktion in Bioreaktoren umgestellt werden, um größere Mengen der Antikörper zu erhalten und die Kosten für deren Produktion zu reduzieren. Die höheren Proteinausbeuten der einzelnen Produktionen würde auch die Chargeninkonsistenz minimiert. Von den MompC- bzw. MompJ-spezifischen Antikörperfragmenten müssen anhand von kompetitiven ELISAs mit Testseren geeignete Kandidaten für das Diagnostiksystem bestimmt werden. Dabei kann dieselbe Strategie eingesetzt werden, die sich für die OmpD-spezifischen scFv-Fragmente bewährt hatte.

Um den diagnostischen ELISA weiter zu optimieren, wurden die isolierten scFv-Fragmente mit einer Biotinylierungsdomäne ausgestattet, die eine *in vivo* Biotinylierung bei Koexpression von BirA in *E. coli* ermöglicht. Die Biotinylierung der scFv-Fragmente hat den Vorteil, dass der Nachweis im Test-ELISA direkt über Streptavidin-HRP geführt werden kann. Die Bindung von Streptavidin an Biotin ist hochspezifisch und nahezu irreversibel, wodurch die Messungenaugkeit aufgrund des Nachweissystems verringert wird. Zur weiteren Verkürzung der Inkubationszeit, könnte das eingesetzte scFv-Fragment bereits mit dem Streptavidin-HRP vorgemischt werden.

In einem neuen Projekt sollen weitere infektiologisch relevante Antigene identifiziert und für die Selektion neuer Antikörperfragmente verwendet werden.



## 5 Zusammenfassung

Salmonellen und *Campylobacter* gehören weltweit zu den wichtigsten Zoonoseerregern und verursachten zusammen 2007 allein Deutschland über 116.000 lebensmittelbedingte Infektionen beim Menschen. Die am häufigsten isolierten Stämme sind *Salmonella* Typhimurium, *Campylobacter coli* und *Campylobacter jejuni*. Schweinefleisch zählt dabei zu den Hauptinfektionsquellen in Industrieländern. Ein in den letzten Jahren immer größer werdende Problematik ist die Entwicklung von multiresistenten Stämmen, die teilweise gegen 17 getestete antimikrobielle Substanzen resistent waren. Dies erschwert die Behandlung im Falle einer Infektion mit diesen Erregern und macht eine lückenlose und zuverlässige Diagnostik bereits im Erzeugerbetrieb erforderlich.

Ziel dieser Arbeit war es, rekombinante Antikörperfragmente gegen die Membranproteine OmpD von *Salmonella* Typhimurium, MompC von *C. coli* und MompJ von *C. jejuni* zu generieren. Diese Antikörperfragmente sollten anschließend in einem tierartübergreifenden kompetitiven ELISA zur Diagnostik eingesetzt werden.

Aus einem subtraktiven *whole-cell*-Panning auf zwei Salmonellenstämmen konnten zwei scFv-Fragmente isoliert werden, die spezifisch an Salmonellen nicht aber an OmpD binden. Alternativ wurde OmpD, MompC und MompJ rekombinant in *E. coli* hergestellt, unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und als Antigene zur Antikörperselektion eingesetzt. Es konnten fünf scFv-Klone gegen OmpD, fünf gegen MompC und ein scFv-Klon gegen MompJ isoliert werden. Die Spezifität der Antikörper wurde mittels ELISA und Western-Blot nachgewiesen. Außerdem wurden die Epitope und das Aggregierungsverhalten der Antikörperfragmente untersucht. Nach abgeschlossener Charakterisierung wurde die Eignung der isolierten scFv-Fragmente für den Einsatz im kompetitiven ELISA überprüft. Das scFv-Fragment TM43-E10 war in der Lage, bei Verwendung eines Salmonellen-positiven Schweineserums, im Vergleich zur Maximalwertkontrolle eine Signalreduzierung von 65 % zu erzielen.

Die in dieser Arbeit isolierten und charakterisierten Antikörperfragmente könnten somit für die Etablierung einer effektiven Diagnostik von Salmonellen und *Campylobacter* bedingten Zoonosen genutzt werden.



## 6 Summary

*Salmonella* and *Campylobacter spec.* are the major pathogens causing zoonoses and elicited 116000 cases of foodborne infections in Germany in the year 2007. *Salmonella* serotype Typhimurium, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter jejuni* are the most frequently isolated bacteria in these cases. Pork is the essential origin of infection in industrial countries. Because of the increasing number of multiresistant pathogens during the last decade a fast diagnostic without interruption is needed.

The aim of this thesis was the isolation of recombinant antibody fragments against the outer membrane proteins OmpD of *Salmonella* serotype Typhimurium, MompC of *Campylobacter coli*, and MompJ of *Campylobacter jejuni* to establish a competitive ELISA for diagnostics.

Two *Salmonella* serotype Typhimurium specific scFv clones were isolated by whole cell panning, but these clones unable to bind to OmpD. An alternative panning with the recombinant antigens OmpD, MompC and MompJ was performed under denaturing conditions. Overall, five scFv clones against OmpD, five scFv clones against MompC, and one clone binding to MompJ were isolated and characterised by ELISA, Western blot and size exclusion chromatography. After characterisation, it was tested, if the scFv fragments were appropriate for competitive ELISA. When using *Salmonella* serotype Typhimurium positive serum the scFv fragment TM43-E10 was able to reduce the ELISA signal. The ELISA signal was reduced about 65 % compared to the sample without serum.

The scFv fragments isolated and characterised in this thesis could be applicable to establish an effective method for diagnostics of zoonoses caused by *Salmonella* serotype Typhimurium and *Campylobacter*.



## 7 Literatur

- Aabo, S., Rasmussen, O. F., Rossen, L., Sørensen, P. D., & Olsen, J. E. 1993. Salmonella identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes* **7**: 171-8.
- Abbas, A., Lichtmann, A., & Pillai, S. 2007. *Cellular an Molecular Immunology*.
- Abbas, A., Lichtmann, A., & Pober, J. 1996. *Immunologie*. Verlag Hans Huber.
- Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A. B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., & Garaizar, J. 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of salmonella in human clinical samples. *Journal of clinical microbiology* **42**: 1734-8.
- Alvi, A. Z., Hu, W., Fulton, R. E., Coles, J. E., Long, M. C., & Nagata, L. P. 2003. Functional enhancement of a partially active single-chain variable fragment antibody to Venezuelan equine encephalitis virus. *Viral immunology* **16**: 213-22.
- Alzari, P. M., Spinelli, S., Mariuzza, R. A., Boulot, G., Poljak, R. J., Jarvis, J. M., & Milstein, C. 1990. Three-dimensional structure determination of an anti-2-phenyloxazolone antibody: the role of somatic mutation and heavy/light chain pairing in the maturation of an immune response. *The EMBO journal* **9**: 3807-14.
- Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A., & Benkovic, S. J. 1991. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 7978-82.
- Beckman, R. A., Weiner, L. M., & Davis, H. M. 2007. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* **109**: 170-9.
- von Behring, E., & Kitasato, S. 1890. The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. 1890. *Molecular immunology* **28**: 1317, 1319-20.
- Bentley, A. T., & Klebba, P. E. 1988. Effect of lipopolysaccharide structure on reactivity of antiporin monoclonal antibodies with the bacterial cell surface. *Journal of bacteriology* **170**: 1063-8.
- BfR. 2008. BfR - Bundesinstitut für Risikobewertung. Retrieved June 5, 2008, from <http://www.bfr.bund.de/search/search.php?words=Zoonosen+2002&x=0&y=0>
- Blaser, M. J., Hopkins, J. A., & Vasil, M. L. 1984. Campylobacter jejuni outer membrane proteins are antigenic for humans. *Infection and Immunity* **43**.
- Bockemühl, J. 1992. *Mikrobiologische Diagnostik, Enterobacteriaceae*. Stuttgart: Georg Thieme-Verlag.

- Bolla, J. M., Loret, E., Zalewski, M., & Pagès, J. M. 1995. Conformational analysis of the Campylobacter jejuni porin. *Journal of Bacteriology* **177**: 4266-71.
- Bolla, J. M., Saint, N., Labesse, G., Pagès, J. M., & Dumas, C. 2004. Crystallization and preliminary crystallographic studies of MOMP (major outer membrane protein) from Campylobacter jejuni. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**: 2349-51.
- Bolton, F. J., Hutchinson, D. N., & Coates, D. 1984. Blood-free selective medium for isolation of Campylobacter jejuni from feces. *Journal of Clinical Microbiology* **19**: 169-71.
- Breitling, F., & Dübel, S. 1997. *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., & Little, M. 1991. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* **104**: 147-53.
- Brooks, Robertson, R. H., Henning, D., & Garcia, M. M. 1995. Production and Western-Blot characterization of monoclonal antibodies specific for Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*: 155-164.
- Brooks, B. W., Robertson, R. H., Lutze-Wallace, C., & Pfahler, W. 2001. Identification, characterization and variation in expression of two serological distinct O-Antigen epitopes in lipopolysaccharides of Campylobacter fetus serotyp A Strain. : 7596-7602.
- Buchanan, S. K. 1999. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Current Opinion in Structural Biology* **9**: 455-61.
- Chasteen, L., Ayris, J., Pavlik, P., & Bradbury, A. R. M. 2006. Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic acids research* **34**: e145.
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., & Winter, G. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* **352**: 624-8.
- Coia, G., Hudson, P. J., & Irving, R. A. 2001. Protein affinity maturation in vivo using E. coli mutator cells. *Journal of immunological methods* **251**: 187-93.
- Crosa, J. H., Brenner, D. J., Ewing, W. H., & Falkow, S. 1973. Molecular relationships among the Salmonellae. *Journal of Bacteriology* **115**.
- Daugherty, P. S., Chen, G., Iverson, B. L., & Georgiou, G. 2000. Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2029-34.
- Dedieu, L., Pagès, J., & Bolla, J. 2002. Environmental regulation of Campylobacter jejuni major outer membrane protein porin expression in Escherichia coli monitored by using green fluorescent protein. *Applied and Environmental Microbiology* **68**.

- Dediste, A., Vandenberg, O., Vlaes, L., Ebraert, A., Douat, N., Bahwere, P., & Butzler, J. 2003. Evaluation of the ProSpecT Microplate Assay for detection of *Campylobacter*: a routine laboratory perspective. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **9**: 1085-90.
- Deng, S. J., MacKenzie, C. R., Sadowska, J., Michniewicz, J., Young, N. M., Bundle, D. R., & Narang, S. A. 1994. Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 9533-8.
- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* **29**: 406-10.
- Dorman, C. J., Chatfield, S., Higgins, C. F., Hayward, C., & Dougan, G. 1989. Characterization of porin and ompR mutants of a virulent strain of *Salmonella typhimurium*: ompR mutants are attenuated in vivo. *Infection and immunity* **57**: 2136-40.
- Engberg, J., On, S. L. W., Harrington, C. S., & Gerner-Smidt, P. 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**.
- Evans, D. 2005. Monoclonal antibody therapies.
- Finnern, R., Pedrollo, E., Fisch, I., Wieslander, J., Marks, J. D., Lockwood, C. M., & Ouwehand, W. H. 1997. Human autoimmune anti-proteinase 3 scFv from a phage display library. *Clinical and experimental immunology* **107**: 269-81.
- Fiszer, D., Pupecka, M., Schmidt, K., Rozwadowska, N., Kamieniczna, M., Grygielska, B., & Kurpisz, M. 2008. Specific Fab fragments recovered by phage display technique recognizing human spermatozoa. *International Journal of Andrology*.
- Fitts, R., Diamond, M., Hamilton, C., & Neri, M. 1983. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. *Applied and Environmental Microbiology* **46**.
- Frangioni, J. V., & Neel, B. G. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical Biochemistry* **210**: 179-87.
- Frank, R. 1992. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. : 9217-9232.
- Garrity, G. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition*. Springer-Verlag.

- Garrity, G., Johnson, K., Bell, J., & Searles, D. 2002. *Taxonomic Outline of the Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer-Verlag.
- Goff, W. L., Johnson, W. C., Molloy, J. B., Jorgensen, W. K., Waldron, S. J., Figueroa, J. V., Matthee, O., Adams, D. S., McGuire, T. C., Pino, I., Mosqueda, J., Palmer, G. H., Suarez, C. E., Knowles, D. P., & McElwain, T. F. 2008. Validation of a competitive ELISA for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*.
- Graff, C. P., Chester, K., Begent, R., & Wittrup, K. D. 2004. Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C. *Protein engineering, design & selection : PEDS* **17**: 293-304.
- Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D., & Hughes-Jones, N. C. 1993. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *The EMBO journal* **12**: 725-34.
- Groves, M., Lane, S., Douthwaite, J., Lowne, D., Rees, D. G., Edwards, B., & Jackson, R. H. 2006. Affinity maturation of phage display antibody populations using ribosome display. *Journal of Immunological Methods* **313**: 129-39.
- Hardaway, K. L., & Buller, C. S. 1979. Effect of ethylenediaminetetraacetate on phospholipids and outer membrane function in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **137**: 62-8.
- Harper, S., & Speicher, D. W. 2008. Expression and purification of GST fusion proteins. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al]* **Chapter 6**: Unit 6.6.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J., & Winter, G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *Journal of molecular biology* **226**: 889-96.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., & Winter, G. 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic acids research* **19**: 4133-7.
- Hoogenboom, H. R., & Winter, G. 1992. By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *Journal of molecular biology* **227**: 381-8.
- Huang, B., Davern, S., & Kennel, S. J. 2006. Mono and bivalent binding of a scFv and covalent diabody to murine laminin-1 using radioiodinated proteins and SPR measurements: effects on tissue retention in vivo. *Journal of Immunological Methods* **313**: 149-60.



- Hust, Maiss, E., Jacobsen, H., & Reinard, T. 2002. The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease. *Journal of virological methods* **106**: 225-33.
- Hust, Toleikis, L., & Dübel, S. 2007a *Handbook of Therapeutic Antidies*. Wiley-VCH.
- Hust, M., Dübel, S., & Schirrmann, T. 2007b. Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **408**: 243-55.
- Huyer, M., Parr, T., Hancock, R., & Page, W. J. 1986. Outer membrane porin protein in *Campylobacter jejuni*. *FEMS microbiology letters* **37**: 247-250.
- Irving, R. A., Kortt, A. A., & Hudson, P. J. 1996. Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering* **2**: 127-43.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. 2002. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Karmali, M. A., Simor, A. E., Roscoe, M., Fleming, P. C., Smith, S. S., & Lane, J. 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *Journal of Clinical Microbiology* **23**: 456-9.
- Kauffmann, F. 1966. *The bacteriology of Enterobacteriaceae*. Copenhagen.
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., & Little, M. 1997. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *Journal of Immunological Methods* **200**: 69-77.
- Kissel, V., Gonzalez, C., Astudillo, M., Godard, A., Wachman, B., & Cabello, F. C. 1994. Salmonella-specific monoclonal antibodies against recombinant Salmonella typhi 36-kilodalton porin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **1**.
- Kist, M. 1986. Who discovered *Campylobacter jejuni/coli*? A review of hitherto disregarded literature. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* **261**: 177-86.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A., & Virnekäs, B. 2000. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of molecular biology* **296**: 57-86.
- Köhler, G., & Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-7.
- Kosunen, T. U., Bång, B. E., & Hurme, M. 1984. Analysis of *Campylobacter jejuni* antigens with monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* **19**: 129-33.

- Kramer, T., Scharner, E., & Gabert, J. 1999. Rationelle Durchführung des Salmonellen-Antikörpernachweises bei Schlachtschweinen.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Lee, & Schnaitman, C. A. 1980. Comparison of outer membrane porin proteins produced by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **142**: 1019-22.
- Liddell, E., & Weeks, I. 1996. *Antikörper-Techniken*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Low, N. M., Holliger, P. H., & Winter, G. 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *Journal of molecular biology* **260**: 359-68.
- Lundquist, R., Nielsen, L. K., Jafarshad, A., Soesoe, D., Christensen, L. H., Druilhe, P., & Dziegiel, M. H. 2006. Human recombinant antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 cloned from peripheral blood leukocytes of individuals with immunity to malaria demonstrate antiparasitic properties. *Infection and Immunity* **74**: 3222-31.
- Maddison, S. E. 1991. Serodiagnosis of parasitic diseases. *Clinical Microbiology Reviews* **4**: 457-69.
- Marks, J. D., Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Clackson, T. P., Bye, J. M., & Winter, G. 1992. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* **10**: 779-83.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., & Winter, G. 1991. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular biology* **222**: 581-97.
- Marshall, & Warren, J. R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**: 1311-5.
- Marshall, & Windsor, H. M. 2005. The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. *The Medical Clinics of North America* **89**: 313-44, viii.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. 1990. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-4.
- Meyer, P. N., Wilmes-Riesenberger, M. R., Stathopoulos, C., & Curtiss, R. 1998. Virulence of a *Salmonella typhimurium* OmpD mutant. *Infection and immunity* **66**: 387-90.
- Mitchell, G. F., Premier, R. R., Garcia, E. G., Hurrell, J. G., Chandler, H. M., Cruise, K. M., Tapales, F. P., & Tiu, W. U. 1983. Hybridoma antibody-based competitive ELISA in

- Schistosoma japonicum infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **32**: 114-7.
- Müller-Loennies, S., MacKenzie, C. R., Patenaude, S. I., Evans, S. V., Kosma, P., Brade, H., Brade, L., & Narang, S. 2000. Characterization of high affinity monoclonal antibodies specific for chlamydial lipopolysaccharide. *Glycobiology* **10**: 121-30.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-73.
- Nachamkin, I., Allos, B. M., & Ho, T. 1998. Campylobacter species and Guillain-Barré syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* **11**: 555-67.
- Nachamkin, I., & Hart, A. M. 1986. Common and specific epitopes of Campylobacter flagellin recognized by monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* **53**: 438-40.
- Nachamkin, I., & Hart, A. M. 1985. Western blot analysis of the human antibody response to Campylobacter jejuni cellular antigens during gastrointestinal infection. *Journal of Clinical Microbiology* **21**: 33-8.
- Nguyen, A. W., & Daugherty, P. S. 2003. Production of randomly mutated plasmid libraries using mutator strains. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **231**: 39-44.
- Nielsen, B., Baggesen, D., Bager, F., Haugegaard, J., & Lind, P. 1995. The serological response to Salmonella serovars typhimurium and infantis in experimentally infected pigs. The time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. *Veterinary microbiology* **47**: 205-18.
- Nikaido, H. 1994. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *The Journal of biological chemistry* **269**: 3905-8.
- Nikaido, H., & Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews* **49**: 1-32.
- Notermans, S., & Wernars, K. 1991. Immunological methods for detection of foodborne pathogens and their toxins. *International Journal of Food Microbiology* **12**: 91-102.
- Page, W. J., Huyer, G., Huyer, M., & Worobec, E. A. 1989. Characterization of the porins of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli and implications for antibiotic susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**: 297-303.
- Park, S. G., Lee, J. S., Je, E. Y., Kim, I. J., Chung, J. H., & Choi, I. H. 2000. Affinity maturation of natural antibody using a chain shuffling technique and the expression of recombinant antibodies in Escherichia coli. *Biochemical and biophysical research communications* **275**: 553-7.

- Parmley, S. F., & Smith, G. P. 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**: 305-18.
- Pelat, T., Hust, M., Laffly, E., Condemine, F., Bottex, C., Vidal, D., Lefranc, M., Dübel, S., & Thullier, P. 2007. High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **51**: 2758-64.
- Penner, J. 1991. *Campylobacter, Helicobacter and related spiral bacteria*. Washington: American Society for Microbiology.
- Perelle, S., Josefsen, M., Hoorfar, J., Dilasser, F., Grout, J., & Fach, P. 2004. A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Molecular and Cellular Probes* **18**: 321-7.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P., & Neri, D. 1998. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *The Journal of biological chemistry* **273**: 21769-76.
- Qian, H., Pang, E., Du, Q., Chang, J., Dong, J., Toh, S. L., Ng, F. K., Tan, A. L., & Kwang, J. 2008. Production of a monoclonal antibody specific for the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* and characterization of the epitope. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 833-839.
- Reeves, M. W., Evins, G. M., Heiba, A. A., Plikaytis, B. D., & 3rd, J. J. F. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology* **27**.
- Reiche, N., Jung, A., Brabletz, T., Vater, T., Kirchner, T., & Faller, G. 2002. Generation and characterization of human monoclonal scFv antibodies against *Helicobacter pylori* antigens. *Infection and Immunity* **70**: 4158-64.
- Retter, I., Althaus, H. H., Münch, R., & Müller, W. 2005. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Research* **33**. Retrieved May 28, 2008, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=540042>
- RKI. 2007. RKI Startseite. Retrieved June 18, 2008, from <http://www.rki.de/>
- Robinson, D. A. 1981. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* **282**: 1584.
- Rolle, M., & Mayr, A. 2002. *Grundlagen der Allgemeinen Medizinischen Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre; Mikrobielle Diagnostik Salmonella*. Stuttgart: Enke Verlag.

- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., & Dübel, S. 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature biotechnology* **19**: 75-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-7.
- Santiviago, C. A., Toro, C. S., Bucarey, S. A., & Mora, G. C. 2001. A chromosomal region surrounding the ompD porin gene marks a genetic difference between Salmonella typhi and the majority of Salmonella serovars. *Microbiology (Reading, England)* **147**: 1897-907.
- Santiviago, C. A., Fuentes, J. A., Bueno, S. M., Trombert, A. N., Hildago, A. A., Socias, L. T., Youderian, P., & Mora, G. C. 2002. The Salmonella enterica sv. Typhimurium smvA, yddG and ompD (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Molecular microbiology* **46**: 687-98.
- Santiviago, C. A., Toro, C. S., Hidalgo, A. A., Youderian, P., & Mora, G. C. 2003. Global regulation of the Salmonella enterica serovar typhimurium major porin, OmpD. *Journal of bacteriology* **185**: 5901-5.
- Schier, R., & Marks, J. D. 1996. Efficient in vitro affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selections. *Human Antibodies and Hybridomas* **7**: 97-105.
- Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., & Marks, J. D. 1996. Isolation of picomolar affinity anti-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *Journal of Molecular Biology* **263**: 551-67.
- Schirmer, T. 1998. General and specific porins from bacterial outer membranes. *Journal of Structural Biology* **121**: 101-9.
- Schmiedl, A., & Dübel. 2004. *Rekombinante Antikörper & Phagendisplay*. Wiley-VCH.
- Sebald, M., & Veron, M. 1963. Base DNA content and classification of vibrios. *Annales De l'Institut Pasteur* **105**: 897-910.
- Selbitz, Sinell, H., & Sziegoleit, A. 1995. *Das Salmonellen-Problem*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Selbitz, H., & Bisping, W. 1995. *Tierseuchen und Zoonosen Alte und neue Herausforderungen*. Jena: Gustav Fischer Verlag.

- Selke, M., Meens, J., Springer, S., Frank, R., & Gerlach, G. 2007. Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. *Infection and immunity* **75**: 2476-83.
- Shands, J. W., Peavy, D. L., Gormus, B. J., & McGraw, J. 1974. In vitro and in vivo effects of endotoxin on mouse peritoneal cells. *Infection and Immunity* **9**: 106-12.
- Silverman, A. P., & Kool, E. T. 2005. Quenched autoligation probes allow discrimination of live bacterial species by single nucleotide differences in rRNA. *Nucleic Acids Research* **33**.
- Singh, S. P., Upshaw, Y., Abdullah, T., Singh, S. R., & Klebba, P. E. 1992a. Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC. *Journal of bacteriology* **174**: 1965-73.
- Singh, S. P., Upshaw, Y., Abdullah, T., Singh, S. R., & Klebba, P. E. 1992b. Structural relatedness of enteric bacterial porins assessed with monoclonal antibodies to *Salmonella typhimurium* OmpD and OmpC. *Journal of bacteriology* **174**: 1965-73.
- Singh, S. P., Williams, Y. U., Klebba, P. E., Macchia, P., & Miller, S. 2000. Immune recognition of porin and lipopolysaccharide epitopes of *Salmonella typhimurium* in mice. *Microbial Pathogenesis* **28**: 157-67.
- Siva, A. C., Kirkland, R. E., Lin, B., Maruyama, T., McWhirter, J., Yantiri-Wernimont, F., Bowdish, K. S., & Xin, H. 2008. Selection of anti-cancer antibodies from combinatorial libraries by whole-cell panning and stringent subtraction with human blood cells. *Journal of Immunological Methods* **330**: 109-19.
- Skirrow, M. B. 1977. *Campylobacter enteritis: a "new" disease*. *British Medical Journal* **2**: 9-11.
- Sletta, H., Nedal, A., Aune, T. E. V., Hellebust, H., Hakvåg, S., Aune, R., Ellingsen, T. E., Valla, S., & Brautaset, T. 2004. Broad-host-range plasmid pJB658 can be used for industrial-level production of a secreted host-toxic single-chain antibody fragment in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7033-9.
- Smith. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)* **228**: 1315-7.
- Soltes, G., Hust, M., Ng, K. K. Y., Bansal, A., Field, J., Stewart, D. I. H., Dübel, S., Cha, S., & Wiersma, E. J. 2007. On the influence of vector design on antibody phage display. *Journal of biotechnology* **127**: 626-37.
- Steele, T. W., & McDermott, S. N. 1984. The use of membrane filters applied directly to the surface of agar plates for the isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *Pathology* **16**: 263-5.

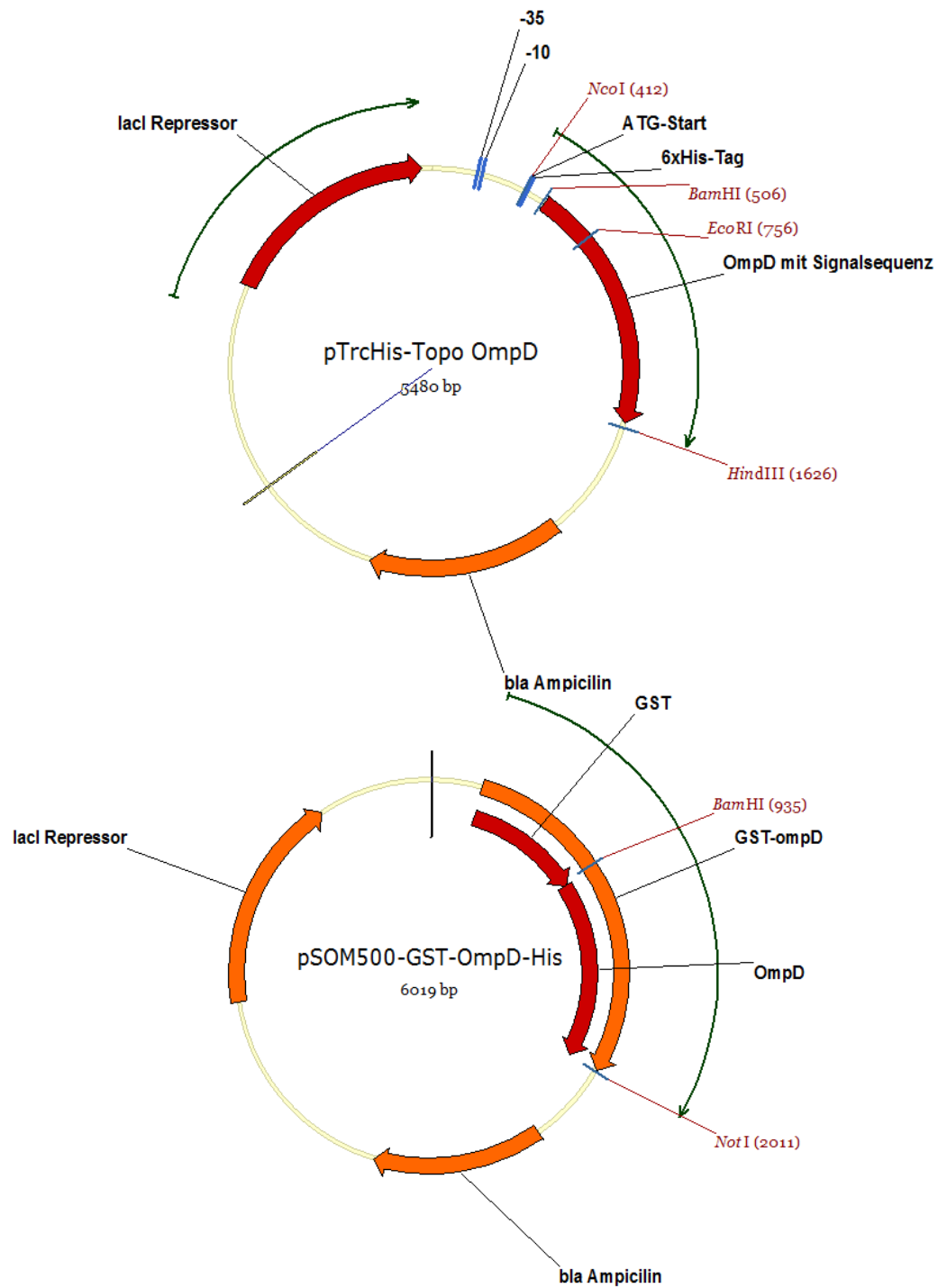
- Steinbach, G., & Staak, C. 2001. [Assessment of the Salmonella burden in slaughter pigs through the results of meat-juice-ELISA.]. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* **114**: 174-8.
- Tachibana, H., Nagakura, K., & Kaneda, Y. 1988. Serodiagnosis of Chagas' disease using monoclonal antibody against Trypanosoma cruzi-specific Mr 25,000 antigen. *Parasitology Research* **74**: 409-14.
- Thie, H. 2008. Antikörpervarianten mit verbesserter Affinität.
- Vandamme, P., & Goossens, H. 1992. Taxonomy of Campylobacter, Arcobacter, and Helicobacter: a review. *Zentralblatt Für Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology* **276**: 447-72.
- Vieira, J., & Messing, J. 1987a. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in enzymology* **153**: 3-11.
- Vieira, J., & Messing, J. 1987b. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in enzymology* **153**: 3-11.
- Watters, J. M., Telleman, P., & Junghans, R. P. 1997. An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology: An International Journal of Immunological Engineering* **3**: 21-9.
- Webster, R. 2001. Phage Display: A Laboratory Manual. Edited by C. F. Barbas III, D. R. Burton, J. K. Scott, and G. J. Silverman. *Analytical Biochemistry* **294**: 194.
- Wörn, A., & Plückthun, A. 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of molecular biology* **305**: 989-1010.
- Xu, M., Xu, X., Chen, G., Deng, X., Li, J., Yu, X., & Chen, M. 2004. Production of a human single-chain variable fragment antibody against esophageal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **10**: 2619-23.
- Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbühl, B., Amstutz, P., Cambillau, C., & Plückthun, A. 2004. Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 18870-7.
- Zhang, Q., Meitzler, J. C., Huang, S., & Morishita, T. 2000. Sequence polymorphism, predicted secondary structures, and surface-exposed conformational epitopes of Campylobacter major outer membrane protein. *Infection and immunity* **68**: 5679-89.
- Zou, N., Newsome, T., Li, B., Tsai, S., & Lo, S. 2007. Human Single-Chain Fv Antibodies Against Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei. *Experimental Biology and Medicine* **232**: 550-556
- .





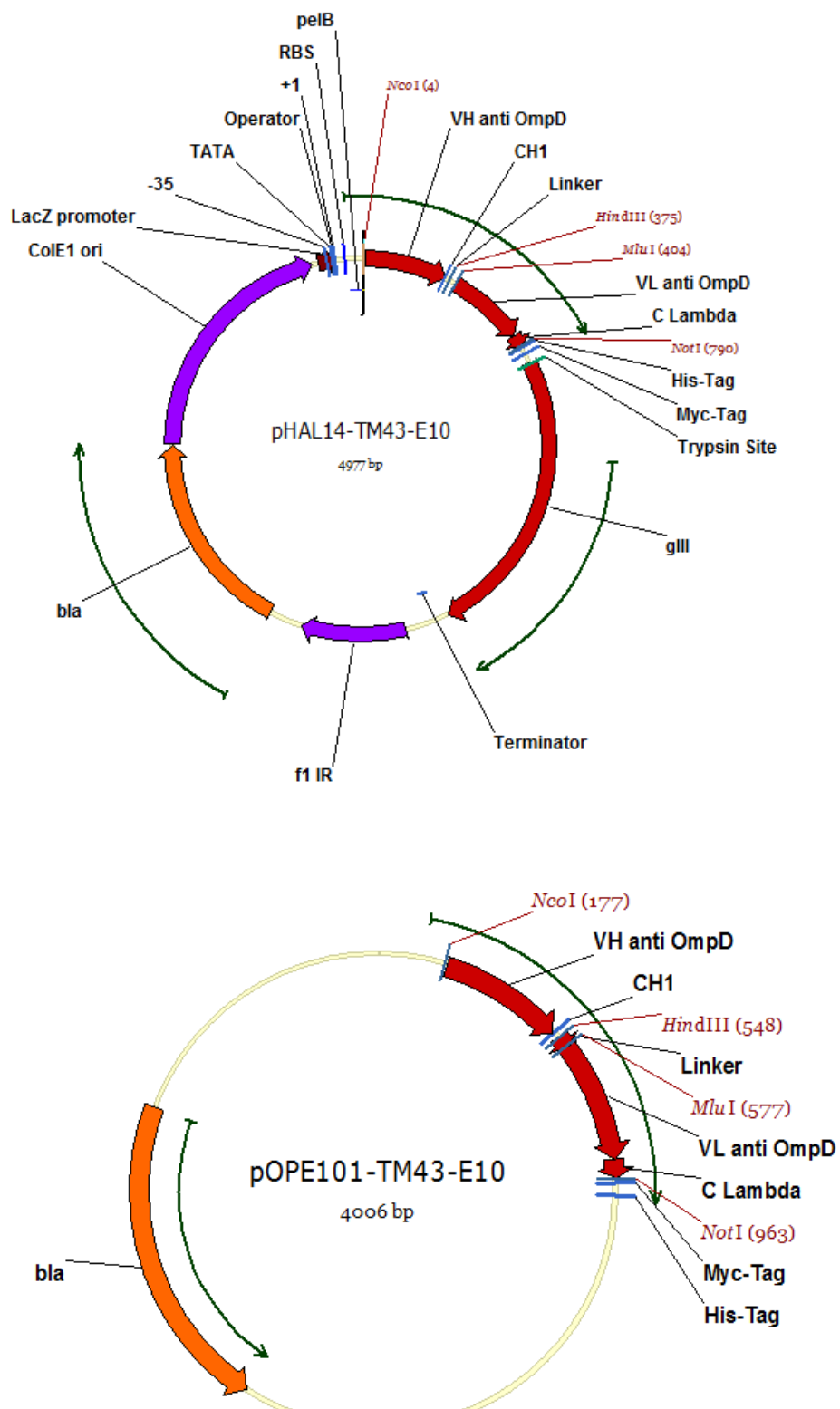
## 8 Anhang

### 8.1 Verwendete Vektoren



**Abbildung 8.1: OmpD-Expressionsvektoren**

Vektorkarten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Expression von OmpD-His<sub>6</sub> und GST-OmpD-His<sub>6</sub>

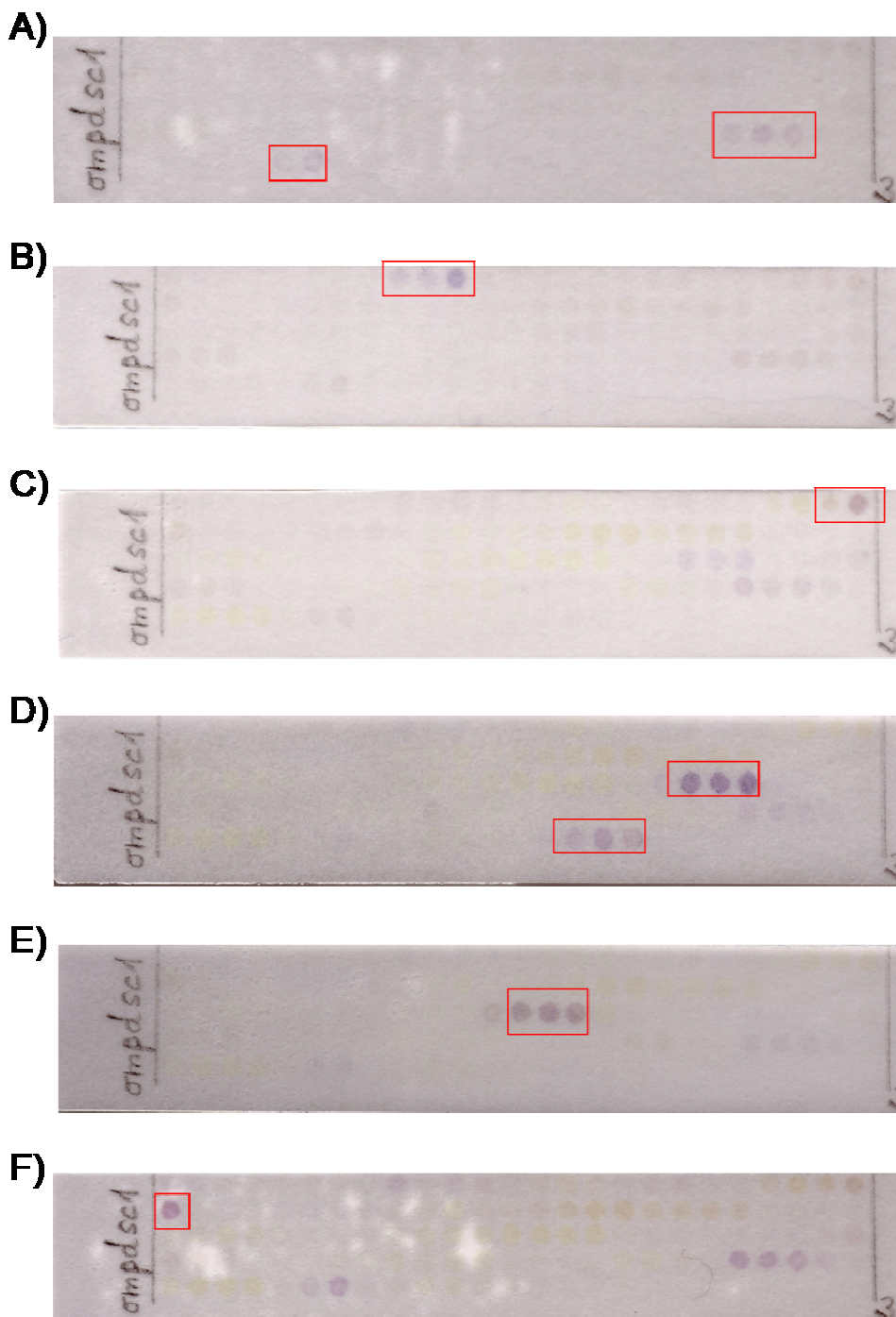


**Abbildung 8.2: scFv-Panning und Expressionsvektoren**

In dieser Arbeit verwendete Panning- und Expressionsvektoren mit dem scFv-Fragment TM43-E10

## 8.2 Membranen für die Epitopbestimmung

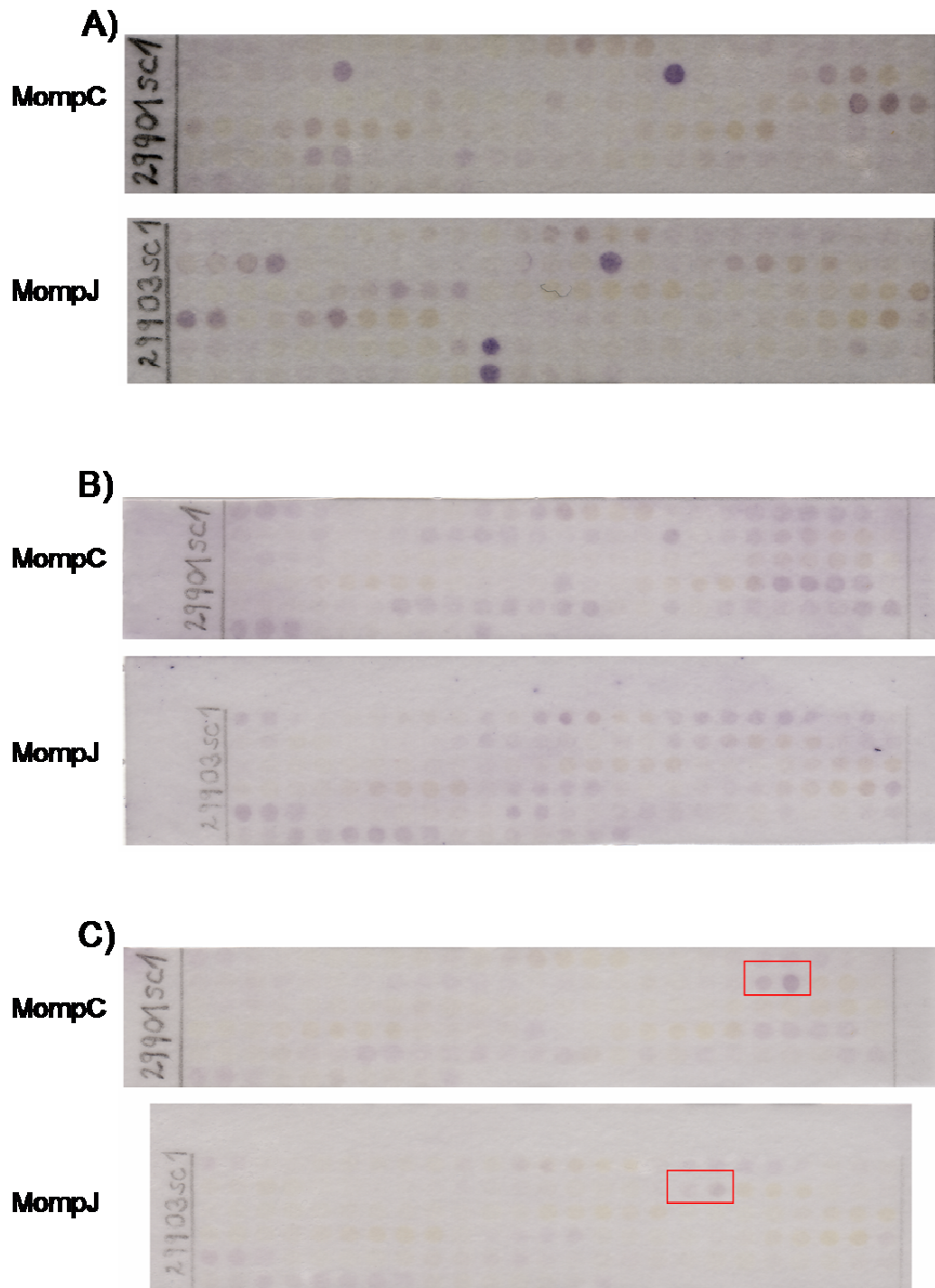
### 8.2.1 Epitope der OmpD-spezifischen scFv-Fragmente

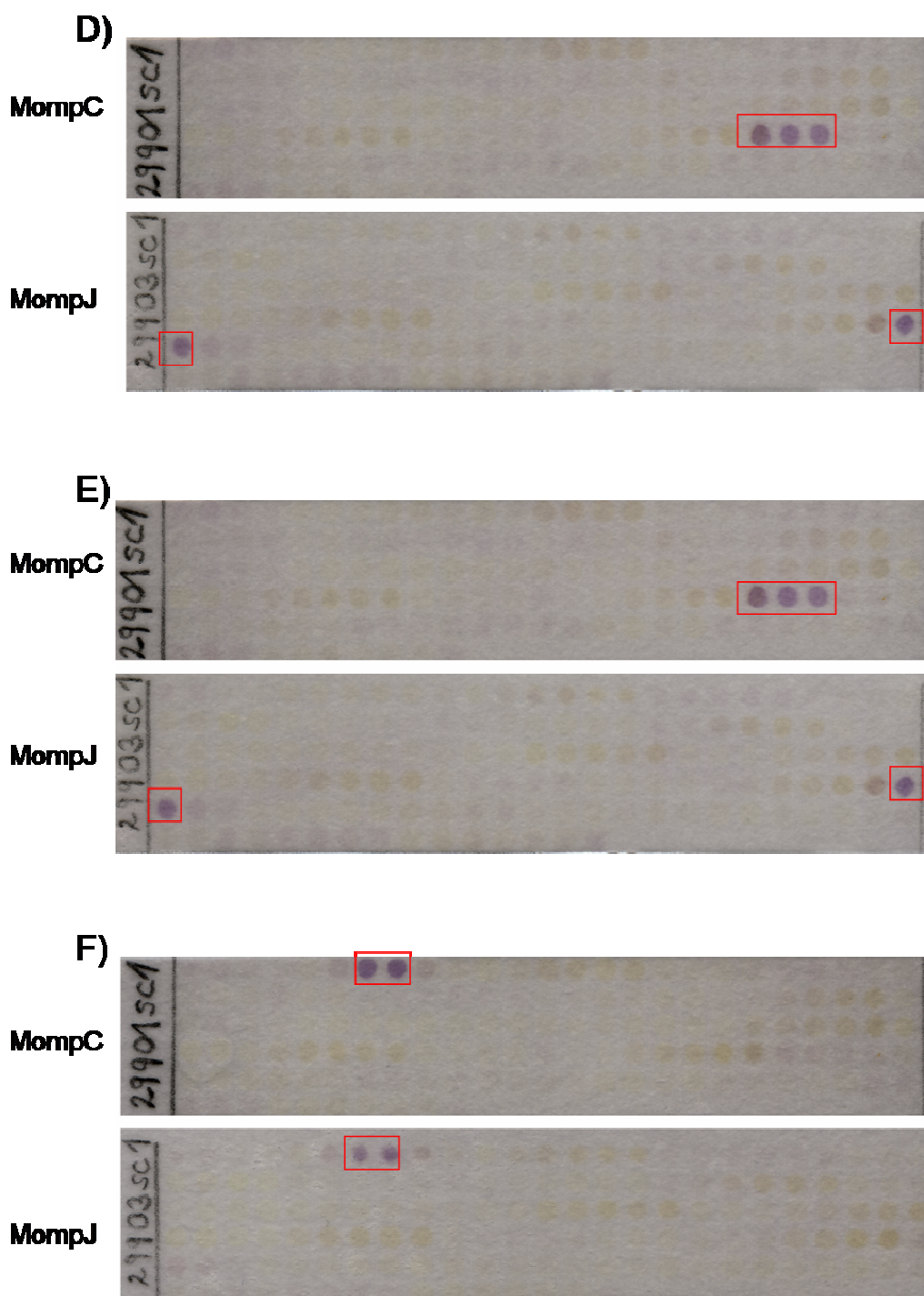


**Abbildung 8.3: Epitopkartierung mittels Peptidmembran**

Epitopkartierung der OmpD-spezifischen scFv-Klone. Es wurden 4  $\mu$ g des scFv-Fragmentes verwendet. **A)** Nachweissystem Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). **B)** TM44-C7 **C)** TM43-E2 **D)** TM43-E10 **E)** TM43-G2 **F)** TM43-F8. Als Substrat wurde MTT/BCIP-Färbelösung verwendet. Die Pfeile kennzeichnen die drei gefärbten Peptid-Spots.

### 8.2.2 Epitope der MompC- und MompJ-spezifischen scFv-Fragmente





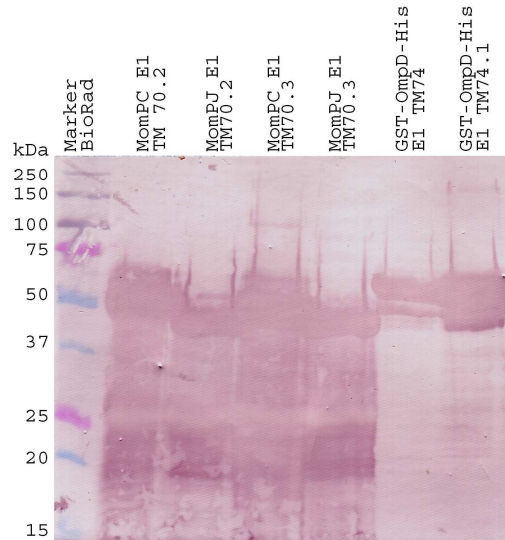
**Abbildung 8.4: Epitopkartierung mittels Peptidmembran**

Epitopkartierung der MompC- und MompJ-spezifischen scFv-Fragmente. Es wurden 4 µg des scFv-Fragments verwendet. Der Nachweis erfolgte mit Maus- $\alpha$ -c-myc-IgG 9E10 (1:500) und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Als Substrat wurde MTT/BCIP-Färbelösung verwendet. **A)** TM78.1.3-D5 **B)** TM78.1.3-D6 **C)** TM78.1.3-G10 **D)** TM80.3-C1 **E)** TM81.3-D1 **F)** TM83.3-A7



### 8.3 Produktion der Antigene OmpD, MompC und MompJ

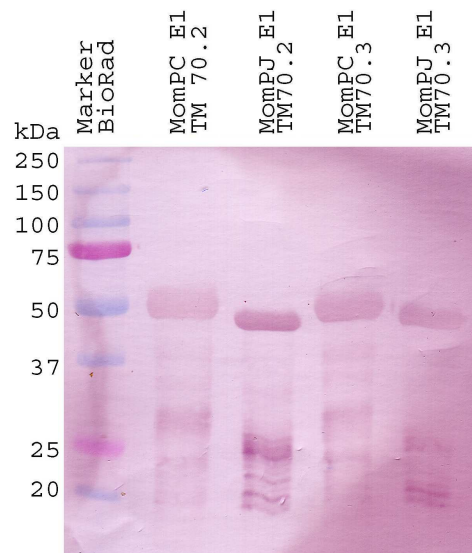
#### 8.3.1 Immunfärbung von GST-OmpD-His<sub>6</sub>



**Abbildung 8.5: Immunfärbung von MompC und MompJ und GST-OmpD-His<sub>6</sub>**

Je 17 µL der Elutionsfraktionen wurden mittels 10 %iger SDS-PAA-Gel aufgetrennt und für den Western-Blot mit anschließender Immunfärbung verwendet. Der Nachweis erfolgte über Maus- $\alpha$ -His<sub>5</sub> (1:500) von Qiagen und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Als Substrat diente NBT/BCIP (je 1:100)

#### 8.3.2 Immunfärbung von MompC und MompJ



**Abbildung 8.6: Immunfärbung von MompC und MompJ**

Je 17 µL der Elutionsfraktionen wurden mittels 10 %iger SDS-PAA-Gel aufgetrennt und für den Western-Blot mit anschließender Immunfärbung verwendet. Der Nachweis erfolgte über Maus- $\alpha$ -His<sub>6</sub> (1:5000) von Roche und Ziege- $\alpha$ -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:10.000). Als Substrat diente NBT/BCIP (je 1:100).

## 9 Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit zur Promotion in seinem Institut und der wissenschaftlichen Betreuung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerald Gerlach bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und der Kooperation während des Projektes.

Herrn Prof. Dr. Ralf R. Mendel danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Michael Hust und Dr. Thomas Schirrmann für die ständige Betreuung meiner Arbeit und vielen hilfreichen Vorschlägen. Allen Arbeitskollegen des Institutes danke ich für die phantastische Arbeitsatmosphäre sowohl im als auch außerhalb des Labors. Zu nennen wären: Holger Thie, Eva Jordan, Nina Strebe, Bernd Voedisch, Mark Schütte, Laila Al Halabi, Aymen el Ghezal, Torsten Rülker, Martina Kirsch und Saskia Helmsing.

Frau Doris Meier danke ich für sehr viele praktische Tipps und Denkanstöße.

Ich danke Dr. Janin Stratmann-Selke und Dr. Katrin Strutzberg-Minder von der IvD GmbH für die kooperative Arbeit und die Bereitstellung sowohl von Antigen- als auch Serummaterial in diesem Projekt. Den Mitarbeitern des mikrobiologischen Institutes der Tierärztlichen Hochschule Hannover danke ich ebenfalls für die Kooperation im Projekt.

Ich danke meinen Praktikanten bzw. Bachelors Nils Tappenbeck, Sabine Becke, Jana Glinemann, Tobias Lübke und Astrid Fieselmann für die praktische Unterstützung bei einigen Experimenten.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter und meiner Schwester für die großartige und liebevolle Unterstützung bei der Verwirklichung all meiner Pläne.